

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/029085 A2(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/705,  
C12N 15/12, A61K 38/17(74) Anwälte: KRAUSS, Jan usw.; Boehmert & Boehmert,  
Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010633

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. September 2003 (24.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 44 457.9 24. September 2002 (24.09.2002) DE(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ [DE/DE]; Saarstrasse 21, 55122 Mainz (DE).

## Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): VOSS, Ralf-Holger [DE/DE]; Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstrasse 21, 55122 Mainz (DE). MATTHIAS, Theobald [DE/DE]; Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstrasse 21, 55122 Mainz (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE RATIONAL MUTAGENESIS OF A/B T CELL RECEPTORS AND CORRESPONDINGLY MUTATED MDM2 PROTEIN-SPECIFIC A/B T-CELL RECEPTORS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR RATIONALEN MUTAGENESE VON  $\alpha/\beta$  T-ZELL REZEPTOREN UND ENTSPRECHEND MUTIERTE MDM2-PROTEIN SPEZIFISCHE  $\alpha/\beta$  T-ZELL REZEPTOREN

(57) Abstract: The invention relates to the rational mutagenesis of polypeptides of a/b T cell receptors providing oncogene-specific T cell response, nucleic acids coding therefor, and the use thereof for treating, diagnosing, and/or preventing cancer diseases. The invention also relates to MDM2 protein-specific a/b T cell receptors which are rationally mutated by means of the inventive method and provide specific T cell response, and the uses thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die rationale Mutagenese von Polypeptiden von Onkogen-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung bei der Therapie, Diagnose und/oder Prävention von Krebserkrankungen. Die Erfindung betrifft weiterhin einen mittels des Verfahrens der vorliegenden Erfindung rational mutierten MDM2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren und dessen Verwendungen.

WO 2004/029085 A2

Verfahren zur rationalen Mutagenese von  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren und entsprechend mutierte  
MDM2-Protein spezifische  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die rationale Mutagenese von Polypeptiden von Onkogen-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung bei der Therapie, Diagnose und/oder Prävention von Krebserkrankungen. Die Erfindung betrifft weiterhin einen mittels des Verfahrens der vorliegenden Erfindung rational mutierten MDM2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren und dessen Verwendungen.

Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten (TZL) ist entscheidend für die Erzeugung und Regulierung einer effektiven Immunantwort. Der charakteristische T-Zelllinien-Marker ist der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TZR). Es gibt zwei sequenzverschiedene Typen von TZR: die heterodimeren  $\alpha/\beta$ -TZR und die strukturell verwandten  $\gamma/\delta$ -TZR. Die jeweiligen Kettenpaare sind über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft und sind mit einem Set von fünf Polypeptiden, dem CD3-Komplex assoziiert und bilden so zusammen den T-Zell Rezeptor-Komplex (TZR-CD3-Komplex). Der  $\alpha/\beta$ -TZR ist der funktionell bedeutendste, da er in über 95% aller T-Zellen exprimiert wird und die tragende Immunantwort vermittelt.

$\alpha/\beta$ -T-Zellen können in zwei verschiedene sich überschneidende Populationen unterteilt werden: Eine Untergruppe, die den CD4-Marker trägt und hauptsächlich die Immunantwort unterstützt ( $T_H$ ) und eine Untergruppe, die den CD8-Marker trägt und im wesentlichen zytotoxisch ist ( $T_C$ ).  $CD8^+$ -T-Zellen erkennen Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Solche Antigene können unter anderem tumorspezifische oder tumorassoziierte Peptidantigene sein. Nach Erkennung der Peptidantigene wird die betreffende Zelle abgetötet, indem die T-Zelle die Zielzelle lysiert und/oder Apoptose dieser Zielzellen induziert oder Zytokine (z.B. IL-2, IFN- $\gamma$ ) freisetzt. Hier liegt ein wesentlicher funktioneller Unterschied zu Antikörpern: TZR erkennen ausschließlich Peptidantigene im Kontext der MHC-Präsentation, wohingegen Antikörper von weiteren akzessorischen Molekülen unabhängige sequentielle oder konformationelle Peptidantigene erkennen. TZR sind daher die geeigneten molekularen

Werkzeuge, Tumorprotein-abgeleitete Antigene zu erkennen und direkt an eine cytotoxische T-Zell-Antwort zu koppeln. Antikörper hingegen dienen in erster Linie dazu, Oberflächenmarker von Zellen als pathogen zu erkennen und sie zu markieren, um in Folge von anderen Effektorzellen z.B. von Makrophagen im Wege der Phagozytose eliminiert zu werden.

Unter den tumorassoziierten Peptidantigenen (TAA), die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, sind die sogenannten "universellen" TAA von besonderem Interesse. Diese TAA leiten sich überwiegend von zellulären Proteinen ab, die in normalen Zellen schwach exprimiert und in Tumorzellen überexprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das humane Homolog des "Mouse-Double-Minute-2" Proto-Onkogens (mdm2), das sogenannte "humane mdm2" oder abgekürzt "MDM2" Proto-Onkoprotein (Roth et al. 1998), das nicht nur in einer Reihe solider Tumore, sondern auch bei den hämatologischen Neoplasien (malignen hämatologischen Systemerkrankungen) AML, ALL und CLL überexprimiert wird (Zhou et al, 2000).

Oligopeptide des MDM2-Proteins können im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden und repräsentieren attraktive Zielstrukturen für CD8-positive T-Zellen. Das Ausmaß der T-Zell Antwort verläuft hierbei in einem definierten kinetischen Fenster (Kersh et al., 1998). Der Komplex aus Peptid-MHC und TZR-CD3 multimerisiert, um eine effiziente Signaltransduktion zu bewirken, wobei die genaue Stöchiometrie und das Ausmaß der Oligomerisierung noch umstritten ist.

Die vorliegende Erfindung behandelt ein biochemisches Problem auf dem Feld der angewandten Immunologie & Onkologie: Focus der Erfindung ist die Entwicklung hoch-effektiver T-Zellen, die über ihre cytotoxische Effektor-Funktion in der Lage sind, humane (Hu) Tumorzellen spezifisch zu erkennen und zu lysieren. Dazu werden CTL-Klone, die spezifisch TAA erkennen, im transgenen murinen (Mu) oder Maus-Modell isoliert (Stanislawski & Voss et al., 2001). Verantwortlich für die Onkoprotein abgeleitete Peptid-Erkennung ist der membranständige TZR auf Seite der T-Zelle, der den Komplex aus membranständigem MHC-Molekül und präsentiertem Peptid, das aus der proteosomalen Prozessierung von Onkoproteinen hervorgegangen ist, auf Seite der Antigen präsentierenden Zelle (APC), oder auch Tumorzelle, erkennt und ein aktivierendes Signal an die Signaltransduktionskaskade der cytotoxischen T-Zelle (CTL) vermittelt.

Die prospektive klinische Anwendung sieht dann vor, periphere T-Zellen des Blutes eines Tumorpatienten zu isolieren, diesen die Gene der TAA-spezifischen TZR durch den adoptiven, gentechnischen Transfer hinzuzufügen und nach massiver Expansion zu reinfundieren (Rosenberg, 1999; Schumacher, 2002).

Der T-Zell-Rezeptor ist ein heterodimeres  $\alpha/\beta$ -Molekül, dessen Ketten jeweils die Transmembrane einmalig durchspannen. Jede Kette besteht aus zwei globulären Domänen, die eine Immunglobulin-ähnliche Faltung vornehmen: die aminoterminal Domäne wird als die variable Domäne ( $V\alpha$  bzw  $V\beta$ ) bezeichnet, da diese aus genetischem Rearrangement hervorgegangen ist und für die individuelle Peptiderkennung zuständig ist. Die sich anschließende Domäne wird die invariante oder auch konstante Domäne ( $C\alpha$  bzw  $C\beta$ ) genannt, da diese streng konserviert ist und im wesentlichen eine Abstandshalterfunktion der variablen Domäne zur Zellmembran innehat sowie regulatorische Proteine an ihr binden. Zuletzt kommt der Abschnitt einer transmembranen Region und eines kurzen carboxyterminalen cytoplasmatischen Endes, an denen der signaltransduzierende CD3-Komplex binden kann. Dieser Aufbau gilt gleichermaßen für humane als auch murine TZR: das Protein-Rückgrat der Spezies-fremden TZR ist mit einem marginalen Unterschied von nur 1,04 Angström superpositionierbar. Insbesondere in der konstanten Domäne sind zahlreiche Aminosäuren homolog bzw. identisch (siehe Figur 1), wie exemplarisch gezeigt für einen murinen (1tcr) zu einem humanen, HLA-A2.1-restringierten TCR (1bd2). Der T-Zell-Rezeptor ist zwar ein heterodimeres Molekül aus zwei Polypeptid-Ketten, besitzt aber im Gegensatz zum Antikörper eine monovalente Bindungsstelle. Antikörper sind prinzipiell Homodimere von heterodimeren Untereinheiten, aus der sich eine bivalente Antigenerkennung ein und desselben Antigens ergibt (d.h. monospezifisch): zwei identische Arme, jeweils bestehend aus einer heterodimeren Aneinanderlagerung einer schweren und einer leichten Kette mit einer sich formierenden Antigen-Bindungsstelle, sind über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft. Daraus ergeben sich Kontaktflächen zwischen den Armen eines Antikörpers, die es beim TZR nicht gibt: hieraus entstanden Fragestellungen (Atwell et al., 1997; WO96/27011), die bivalente Antigenerkennung dahingehend zu verändern, jede der beiden Antigen-Bindungsstellen ein unterschiedliches Antigen erkennen zu lassen, also eine Bispezifität im gesamten Antikörper-Molekül einzuführen. Dies dient letzten Endes beispielhaft dazu, daß ein Antikörper sowohl ein gewebsspezifisches Antigen als auch ein pathogenes Antigen erkennt. Dieses Ziel ist beim

TZR nicht realisierbar, da dieser strukturell nur einem der beiden Arme eines Antikörpers entspricht, also monovalent und damit zwangsläufig monospezifisch ist.

Eine andersgeartete Fragestellung ergibt sich für die therapeutische Anwendung von TZR: dieses besteht darin, daß die polyklonale T-Zellpopulation des Patienten eigene, sogenannte endogene, T-Zell-Rezeptoren unbekannter Spezifität trägt. Ein funktioneller TZR formiert sich aus der Paarung der beiden Ketten im Wege des Endoplasmatischen Retikulum (ER)- und Golgi-prozessionalen Vorganges zu einem an die Zell-Oberfläche geleiteten TZR/CD3-Komplexes. Da die heterodimeren Ketten zunächst vereinzelt exprimiert werden und zudem hinreichende Homologie zwischen den humanen und murinen Ketten bestehen, können die exogen hinzugefügten TZR mit den endogenen Ketten paaren und unbekannte, im ungünstigen Fall ungewünschte Monospezifitäten (Autoimmun-Reaktionen) hervorrufen. Im einfachsten Fall ergeben sich aus den vier vorhandenen Ketten (zwei endogene und zwei exogene Ketten) einer mit den Genen für einen TZR-transduzierten T-Zelle vier denkbare Kombinationen, von denen zwei ungewünschte Hu  $\alpha$ TZR/Mu  $\beta$ TZR und Mu  $\alpha$ TZR/Hu  $\beta$ TZR - Hybride sind. Die Situation verkompliziert sich zusätzlich dann, wenn mehrere, für verschiedene TAA spezifische TZR-Gene transduziert werden bzw. dadurch, daß zuweilen in einer T-Zelle zwei funktionelle TZR aufgrund eines insuffizienten allelischen Ausschlusses der einen von zwei genomischen  $\alpha$ -Ketten exprimiert werden. Zudem werden im Rahmen einer klinischen Applikation voraussichtlich nicht-klonale T-Zell-Populationen transduziert, so daß hieraus eine Vielzahl denkbarer hybrider TZR auf Populationsebene vorliegen.

Eine solche hybride Form ist bisher nicht bewiesen worden, kann aber aufgrund der bisher vorliegenden strukturellen Daten wie TZR-Protein-Kristallstrukturen (Garcia et al., 1998; Ding et al., 1998) nicht ausgeschlossen werden. Es konnte aber im Labor der Erfinder gezeigt werden, daß eine fremde, einzelne Maus-TCR $\beta$ -Kette, die in humane T-Zellen eingeschleust wird, nur dann an der Oberfläche exprimiert wird, wenn diese in der Lage ist mit den endogenen humanen TCR $\alpha$ -Ketten zu paaren. Da dies nachweisbar war und die exogene Expression im Fall partiell humanisierter TCR $\beta$ -Ketten verstärkbar, bzw. durch das Einführen von Punktmutationen, die das Paaren behindern (siehe unten beschriebener Ansatz „kompensierte Einführung eines exponierten Ladungsträgers“), abschwächbar war, ist dies ein starkes Indiz für das Vorhandensein hybrider TZR. Zu einer erhöhten Sicherheit bei der Anwendung von TZR gilt es daher, solche Hybridformen so weit wie möglich auszuschließen.

Ein Lösungsweg zur Umgehung der ungewünschten Kettenpaarung ist das Design von Einzelketten-T-Zell-Rezeptoren. Dieser Ansatz wurde ursprünglich für Antikörper entwickelt (Eshhar et al., 1993; 2001), konnte aber aufgrund der strukturellen Homologien zwischen Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren auf letztere übertragen werden (Chung et al., 1994; Weijtens et al., 1998; Willemsen et al., 2000). Hierbei werden die variablen Domänen über ein kurzes Peptid, einen "Linker", miteinander kovalent unter Wegfall der einen von beiden konstanten Domänen verknüpft. Solche Konstrukte sind gentechnisch beliebig konzipierbar und gewährleisten eine biochemisch gekoppelte 1:1-Stöchiometrie der heterodimeren, variablen Domänen (siehe dazu auch Figur 3).

Alternativ werden an die jeweiligen Ketten des heterodimeren Moleküls kurze Peptidsequenzen als Affinitäts-anhängsel gentechnisch angefügt, die für eine spezifische Kettenpaarung Sorge tragen: hierzu wurden T-Zell-Rezeptoren 30 Aminosäure lange, carboxyterminale "tags", ein sogenannter "leucine zipper", als Dimerisierungsmotiv angefügt (Chang et al., 1994). Diese letztgenannten Verfahren haben den Nachteil, aufgrund ihres rekombinanten Charakters potentielle Fremdantigene darzustellen, die zu Abstoßungsreaktionen im Empfängerorganismus führen.

Zudem kann die modifizierte Primär- und Tertiärstruktur, die deutlich von der Wildtypstruktur humaner als auch muriner TZR abweicht, die Stabilität und Funktionalität dieser chimären Konstrukte beeinträchtigen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die Herstellung rekombinante TZR ermöglicht, so daß bevorzugt die von außen zugeführten TZR-Ketten paaren und nicht gemischte Pärchen mit den endogenen Ketten der T-Zellen ausbilden, ohne dabei deren Funktionalität und Stabilität zu beeinträchtigen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren spezifischen Wildtyp- oder chimären T-Zell Rezeptor (TZR), der eine erste Kette und eine zweite Kette enthält, die miteinander an mindestens einer Oberfläche wechselwirken, wobei die mindestens eine Oberfläche einer rationalen Mutagenese unterzogen wird, so daß die mindestens eine Oberfläche der ersten Kette oder die Oberfläche

der zweiten Kette eine räumlich hervorstehende Gruppe umfaßt, die mit einer räumlich zurückgesetzten auf der mindestens einer Oberfläche der entsprechenden ersten Kette oder zweiten Kette wechselwirkt, gelöst. Bevorzugt ist die von der mindestens einer Oberfläche der ersten Kette oder der Oberfläche der zweiten Kette umfaßte räumlich hervorstehende Gruppe eine geladene und/oder polare Gruppe, und weiterhin bevorzugt ist die räumlich zurückgesetzte Gruppe auf der mindestens einer Oberfläche der entsprechenden ersten Kette oder zweiten Kette eine entgegengesetzt geladene und/oder polare Gruppe. Hierbei kann es genügen, eine exponierte Ladung einseitig zu inserieren, wenn die gegenüberliegende Kontaktfläche diese Veränderung kooperativ kompensieren kann oder aber es erfordern, eine entgegengesetzte zurückversetzte Ladung komplementär einzuführen. Im folgenden soll dieser neuartige Ansatz mit der „kompensierten Einführung eines exponierten Ladungsträgers“ bezeichnet und beschrieben werden (Figur 11). Jedes „+“ - als auch „-“ - Symbol beschreibt eine echte Ladung oder eine polare Ladung. Eine echte Ladung (z.B. die geladene Guanidinium-Gruppe von Arginin) kann erst durch mehrere polare Gruppen (z.B. Carbonyle der Peptidgruppen) mehrerer Oberflächen (Aminosäuren) hinreichend kompensiert werden. Dies wird durch die nicht-stöchiometrische Darstellung der Ladungssymbole angedeutet: in vielen Fällen zeigt eine sterisch exponierte echte Ladung der einen Kette (def. als räumlich hervorstehende Gruppe) in eine Höhle der anderen Kette (def. als räumlich zurückversetzte Gruppe), die mit mehreren polaren oder auch geladenen Gruppen ausgekleidet ist. Selbst echte Ladungen kompensieren sich nicht direkt 1:1, da dies auch von der betreffenden (dielektrischen) Zugänglichkeit und Entfernung benachbarter entgegengesetzter Ladungen abhängt. Sowohl in Hinblick auf Sterik als auch Ladung müssen die betreffenden Gruppen nicht direkt 1:1 umgesetzt invertiert werden, sondern dies bedarf einer individuellen strukturellen Analyse, ggfls. z.B. unter Wegfall einer polaren Gruppe innerhalb der die Ladungsträger beinhaltenden Höhle, um einen möglichst kompensatorischen Effekt zu erzielen. Nicht nur der Zustand V, in dem eine betreffende invers bezogene Ladungsträger-Oberfläche auf den jeweiligen Ketten fehlt, entspricht hierbei dem Wildtyp, sondern jeder der Zustände I-IV kann ebenso dem vorgefundenen Ausgangszustand der Polypeptidketten entsprechen.

Hierbei besteht die Möglichkeit, ausschließlich die gegebenen sterischen Verhältnisse zu invertieren (I/II bzw. III/IV in Figur 11), die Ladungen zu invertieren (I/IV bzw. II/III in Figur 11) oder beides (II/IV bzw. I/III in Figur 11). Der besondere Fall der Inversion der geladenen und/oder polaren Sterik (I/II der Figur 11) dient als an T-Zell-Rezeptoren experimentell belegtes Beispiel (Figur 2).

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Schritte von (a) zu Verfügung stellen der DNA-Moleküle, die die kodierenden Bereiche für die mindestens eine zu mutierende Oberfläche der ersten Kette oder zweiten Kette umfassen, in einem gemeinsamen oder getrennten Mutagenese-Vektorsystem(en), (b) Mutagenese der DNA-Moleküle auf an sich bekannte Weise, wobei die für die mindestens eine Oberfläche kodierende Nukleinsäuresequenz im Vergleich zu der Ausgangssequenz so verändert wird, daß in die mindestens eine Oberfläche der ersten Kette oder die mindestens eine Oberfläche der zweiten Kette eine räumlich hervorstehende, bevorzugt geladene und/oder polare Gruppe eingeführt wird, und in die entsprechend in Wechselwirkung stehende mindestens eine Oberfläche der zweiten Kette oder der ersten Kette eine räumlich zurückgesetzte, bevorzugt entgegengesetzt geladene und/oder polare Gruppe eingeführt werden kann, wodurch einzelne Mutanten-Fragmente hergestellt werden c) Translation von mindestens zwei der einzelnen Mutanten-Fragmente aus Schritt b), so daß die Paarung des heterodimeren, mindestens an einer Oberfläche mutierten spezifischen erste-Kette/zweite-Kette TZR selektiv gefördert wird, und d) Präsentation des heterodimeren erste-Kette/zweite-Kette TZR durch eine T-Zelle.

Unter einer "Oberfläche" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird der Bereich einer Kette eines TZR verstanden, der mit einem bestimmten Bereich der zweiten Kette des TZR wechselwirkt. Diese Wechselwirkung allein oder in Zusammenhang mit anderen führt zu der Ausbildung von Paaren von Ketten, die aktive TZR bilden. Die Summe der Wechselwirkungen beruht auf elektrostatischen, Dipol-Dipol-, Van der Waals-Kontakten und hydrophoben Wechselwirkungen die durch die Aminosäuresequenzen als auch die strukturellen Anordnungen der Polypeptidketten untereinander und zueinander bestimmt werden. Aufgrund einer punktuellen Veränderung sollte die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Heterodimers unbeeinflusst bleiben. Ohne auf einen bestimmten Wirkmechanismus festgelegt sein zu wollen, gehen die Erfinder davon aus, daß grundsätzlich durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung gezielt auf die Kombination aus Ladung und Sterik von Seitenkette(n) eingewirkt wird, ohne das Protein-Rückgrat zu verändern. Die Modifikation von sterischen Gegebenheiten zwischen interagierenden Oberflächen ist in vielen Fällen nicht ausreichend, da selbst sterisch große Seitenketten (Valin, Phenylalanin) derart die lokale Struktur unter Verdrängen benachbarter Seitenketten, ob nun die eigene Kette (Oberfläche) oder die komplementäre Kette (Oberfläche) betreffend, verändern, daß diese ohne Effekt auf die Ketten- (Oberflächen-)Paarung räumlich innerhalb der Kontaktfläche untergebracht werden. Einen wirkungsvollen Beitrag leistet die Abstoßung



durch Ladungsgegensätze, da punktförmige Ladungen gemäß dem Coulomb-Gesetz sphärisch mit  $1/Dr^2$  im Raum wirken. Mit zunehmendem Abstand nimmt die einwirkende Kraft exponentiell ab und sorgt somit für eine lokal restringierte Wirkung der Punktladung ohne weitreichende Auswirkung auf die Tertiär- und Quartärstruktur. Die Dielektrizitätskonstante  $D$  ist in apolaren Milieus, wie es im Innern von Proteinen oder auch an Kontaktflächen von Untereinheiten der Fall ist, niedriger und die Kraft die auf entgegengesetzte Ladungen wirkt hiermit eine größere. Um den potentiell durch sterische Abstoßung induzierten (oder auch ausgebliebenen) Effekt auf die Oberflächen-Interaktion zu verstärken (bzw. überhaupt erst zu initiieren), werden Aminosäurereste mit sterisch exponierten Seitenketten mit Ladungen (z.B. Arginin, Lysin, Glutamat), pH-induzierbaren Ladungen (z.B. Histidin) oder polaren Gruppen gewählt (z.B. Glutamin). Dies geschieht bevorzugt durch Veränderungen auf der Primärstruktur-Ebene der Kette, nämlich durch Aminosäureaustausche in derselben. Die punktuelle Wirkung sowohl der Sterik als auch der Ladung zweier interagierender Oberflächen (z.B. zweier interagierender Aminosäuren entgegengesetzter Ladung und reziproker Sterik) gewährleistet die Integrität der Raumstrukturen der betreffenden Ketten selbst, induziert aber durch die räumlich begrenzte Störung im Fall der Interaktion zweier exponierter bzw. zurückversetzter gleichgerichteter geladener Oberflächen, wie es für die Interaktion einer unveränderten mit einer mutierten Kette einträte, eine Schwächung der Paarung. Die komplementären Oberflächen hingegen neutralisieren sich gegenseitig hinsichtlich Sterik und Ladung.

Eine Alternative des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft ein Verfahren, in dem der oben genannte Schritt c) durch folgende Schritte ersetzt wird: (c') gegebenenfalls Umklonierung der Mutanten-Fragmente in geeignete Transfektions-Vektorsysteme oder Transduktions-Virus-abgeleitete Systeme, (c'') Transfektion oder Cotransfektion oder Transduktion mindestens zwei der Mutanten-Fragmente in eine Mutanten TZR-defiziente T-Zelle, und (c''') Expression des heterodimeren erste-Kette/zweite-Kette TZR in einer rekombinanten T-Zelle. Diese Variante betrifft den Transfer des genetischen Konstrukts und dessen anschließende Expression direkt in einer rekombinanten T-Zelle. Während diese Alternative bevorzugt ist, kann in einer weiteren Alternative des erfindungsgemäßen Verfahrens Schritt c) oben durch folgende Schritte ersetzt werden: c') *In vitro*-Translation oder *in vivo*-Translation von mindestens zwei der einzelnen Mutanten-Fragmente aus Schritt b) und gegebenenfalls anschließende Isolierung und/oder Reinigung der translatierten Mutanten-Fragmente, so daß die Paarung des heterodimeren, mindestens an einer Oberfläche mutierten spezifischen ersten-

Kette/zweite-Kette TZR selektiv gefördert wird, und c“) Einbringung der mutierten spezifischen ersten-Kette/zweite-Kette TZR in eine T-Zelle.

Dabei erfolgt somit eine Expression des mutierten TZR außerhalb der zuletzt vorgesehenen präsentierenden T-Zelle und eine anschließende Einbringung des TZR in dieselbe. Bei der *in vitro* Translation kann die Translation in zellfreien Systemen erfolgen, die käuflich erhältlich sind. Die “Translation” umfaßt aber auch die rein synthetische Herstellung der Peptidketten, die weiter unten im Rahmen der Peptide genauer erläutert wird. Im Falle der *in vivo* Translation kann diese in einer geeigneten Wirtszelle erfolgen, die vorher mit einem Expressionskonstrukt der Kette transformiert wurde und diese anschließend herstellt. Geeignete Vektoren und Verfahren zur Expression sind dem Fachmann im Stand der Technik ausreichend bekannt. Nach der Expression kann es erforderlich sein, die Expressionsprodukte entweder aus den Zellen zu reinigen oder aus dem Medium zu extrahieren, in das sie gegebenenfalls durch die Wirtszelle exkretiert wurden. Geeignete Wirtszellen sind ebenfalls bekannt und können Hefe, CHO-Zellen, Insektenzellen, Bakterien oder andere sein.

Die Einbringung in die T-Zielzellen kann auf jede bekannte Weise erfolgen, die eine anschließende Präsentation des TZR durch die T-Zelle ermöglicht. Wege sind zum Beispiel über die Induktion von Phagocytose durch die Zellen oder ein Verfahren, wobei die Einbringung durch Lipid-vermittelten Transfer, wie zum Beispiel über Micellen oder Liposomen-Transfer erfolgt. Eine Übersicht über die Verwendung von Liposomen gibt u.a. der Artikel Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. J Biomater Appl 2001 Jul;16(1):3-21. Der Transfer über Micellen ist dem Fachmann im Stand der Technik aus zahlreichen Publikationen bekannt.

Bevorzugterweise wird erfindungsgemäß als heterodimerer spezifischer Wildtyp- oder chimären T-Zell Rezeptor (TZR) ein alpha/beta TZR, gamma/delta TZR, ein humanisierter oder partiell humanisierter TZR, ein mit zusätzlichen (funktionellen) Domänen versehener TZR, ein mit alternativen Domänen versehener TZR, wie z.B ein mit einer anderen Transmembran-Domäne als Membrananker versehener TZR modifiziert.

Backstrom et al. (Backstrom BT, Hausmann BT, Palmer E. Signaling efficiency of the T cell receptor controlled by a single amino acid in the beta chain constant region. J Exp Med. 1997 Dec 1;186(11):1933-8) beschreiben eine Gln<sub>136</sub>Phe-Mutation im beta-TZR. Diese liegt im

"beta chain connecting peptide domain" nahe an der Transmembrane. Der beschriebene Austausch liegt weitab von den in der vorliegenden Erfindung als für die rationale Mutagenese ermittelten brauchbaren Punktmutanten. Zudem wird eine Wirkung auf die Paarung der Ketten nicht analysiert, sondern ausschließlich eine Funktionalität der TZR.

Backstrom et al. (Backstrom BT, Milia E, Peter A, Jaureguiberry B, Baldari CT, Palmer E. A motif within the T cell receptor alpha chain constant region connecting peptide domain controls antigen responsiveness. *Immunity*. 1996 Nov;5(5):437-47.) beschreiben chimäre TZR, deren Fusionspunkte jenseits des terminalen Intra-Ketten - Cysteins liegen und insbesondere ein Motiv der "alpha chain connecting peptide domain" FETDxNLN betraf. Beide Mutationenregionen liegen dicht an der Transmembran-Domäne, also weitab von den von hier als wesentlich beschriebenen Punktmutanten. Reziproke Aminosäureaustausche (knob-hole) werden nicht durchgeführt.

Li et al. (Li ZG, Wu WP, Manolios N. Structural mutations in the constant region of the T-cell antigen receptor (TZR) beta chain and their effect on TZR alpha and beta chain interaction. *Immunology*. 1996 Aug;88(4):524-30) und WO 97/47644 und WO 96/22306 beschreiben die Paarungsanalyse von TZR. Die Paarung wird durch Immunpräzipitation und 2D-Gelelektrophorese mit einem vorangegangenen metabolischem Markieren der Ketten analysiert. Die Autoren kreierten chimäre betaTZR zu einem nicht immunologisch relevanten Molekül und untersuchten, ob diese verschieden lang dem Wildtyp der beta-Kette noch entsprechenden Chimären mit der alpha-Kette paarten. Die Chimären umfassen verschiedene Bereiche insbesondere der konstanten Domäne, bezeichnen aber nicht die im Rahmen der vorliegenden Erfindung beschriebenen Punktmutanten. Die Pairing-Eigenschaften werden weder unter dem Einfluß der Mutagenese auf beiden Ketten noch im Rahmen einer sterischen Inversion (knob-hole) untersucht.

Die Autoren ziehen jedoch zwei für die Erfindung sehr wichtige Schlüsse: Zum einen ist die konstante Domäne maßgeblich für das Pairing verantwortlich, wobei dabei besonders der Bereich Ser<sub>188</sub>-Leu<sub>213</sub> des betaTZR interessant sei, der besonders viele basische Aminosäuren (Arginin<sub>208</sub> bzw. Arginin<sub>195</sub> des 1ter) enthält und wahrscheinlich wesentlich für das Pairing ist. Darauf wird in dieser Publikation jedoch nicht weiter eingegangen.

Die Fragestellung der spezifischen Manipulierung der Molekül-Interaktion wurde bereits versucht, über sterisch komplementäre Gruppen zu lösen (Belshaw et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34 (1995), 2129-2132) und anhand von Antikörpern exemplifiziert (WO 96/27011; Atwell et al., 1997; Carter, 2001): hierzu sollten spezifisch die schweren Ketten zwei verschiedener Antikörper einer unterschiedlichen Epitop-Spezifität miteinander paaren, indem sterisch in Kontakt tretende Aminosäure-Seitenketten an der Kontaktstelle der beiden Ketten in ihrer sterischen Raumverteilung invertiert werden: eine im Wildtyp bestehende kleine Aminosäure, die mit einer Aminosäure mit einer großen Seitenkette der anderen Kette interagiert, wird zu einer Aminosäure mit einer großen Seitenkette gentechnisch mutiert, wohingegen der große Aminosäure-Partner zu einem kleinen Rest getauscht wird (im Engl. "knob-hole" - Modell). Im Fall der Kettenpaarung beider mutierten Ketten treffen wiederum eine kleine auf eine große Aminosäure aufeinander, allerdings mit sterischer Inversion. Sollte das direkte Umfeld der Punktmutanten diesen sterischen Austausch zulassen, sollte die eigentliche Funktionalität des heterodimeren Moleküls (sprich die Epitop-Erkennung) nicht beeinträchtigt sein. Die WO 96/27011 beschreibt bispezifische Antikörper, Immunadhäsine oder Chimären davon. Dieser Ansatz läßt aber vollkommen die zusätzliche Steuerung der Interaktion von Oberflächen durch die Einführung von Ladungsgegensätzen außer acht, ist also lediglich ein 1-parametrisches Konzept. In dem hier beschriebenen Ansatz wird ein streng kombinatorisches, 2-parametrisches Konzept vorgestellt, das sowohl die Sterik als auch die Ladung berücksichtigt und damit impliziert, daß ein 1-parametrischer Ansatz in vielen Problemstellungen nicht vergleichbar effektiv die Kettenpaarung im gewünschten Sinne manipuliert. Das „knob hole“-Modell und das hier als die „kompensatorische Einführung von exponierten Ladungsträgern“ beschriebene Modell sind daher als unabhängige Strategien zu erachten. Das letztere Modell läßt auch deutlich mehr Spielraum bei der Wahl der einzuführenden Mutationen zu und damit ein breiteres Spektrum an Lösungsmöglichkeiten.

Atwell et al. versuchten, bispezifische Antikörper herzustellen, in dem sie die zwei Hälften Epitop-differenter Antikörper an ihren Kontaktstellen ( $\text{CH}_3$ -Domäne) der schweren Ketten miteinander verknüpfen (über "knob-hole"). Dabei bestehen wesentliche Unterschiede zu der vorliegenden Erfindung, die bei einem Transfer des Prinzips von Antikörpern auf TZR zu berücksichtigen sind. Ein Antikörper ist bivalent im Gegensatz zum monovalenten TZR. Das Resultat ist ein strukturell heterodimerer Antikörper, der zwei verschiedene Epitope erkennt (bispezifisch). Der erfindungsgemäße Ansatz geht in eine andere Richtung: hier wird versucht, die zwei predestinierten Ketten eines monospezifischen TZRs gezielt zu

verknüpfen, damit eben keine funktionell heterodimere TZR mit potentiellen, von der gewünschten Monospezifität abweichenden Monospezifitäten entstehen.

Die Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren erfolgte erfindungsgemäß durch "rationales Design": hierzu wurden bestehende TZR-Kristallstrukturen mittels Struktur-darstellender Software studiert und Aminosäure-Kandidaten zwecks punktueller Mutagenese bestimmt. Die Qualität der Aminosäureaustausche (den natürlichen Aminosäuresatz von 20 codogenen Aminosäuren in Säugern antizipierend) wurde je nach vorliegenden sterischen Gegebenheiten jeweils interagierender Aminosäurepaare unter Berücksichtigung des Umfeldes direkt benachbarter Aminosäuren individuell beurteilt. Das Modell-System, das etabliert wurde, um den Einfluß der Punktmutanten zu studieren, wird unten genauer beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur rationellen Mutagenese von TZR wird somit durch die oben genannten Publikationen sowie in der übrigen Literatur weder erwähnt noch nahegelegt. Die erfindungsgemäß eingeführten Punktmutationen je Kette sollen bewirken, daß präferentiell die von außen zugeführten TZR-Ketten paaren und nicht gemischte Pärchen mit den endogenen Ketten der T-Zellen ausbilden. Dies ist ein erheblicher Beitrag zum Thema Spezifität und damit Sicherheit der T-Zell-Antwort.

Im Unterschied zum Stand der Technik ist zu betonen, daß Punktmutanten deutlich geringer immunogen wirken als eingefügte, mehrere Aminosäuren umfassende Affinitäts-Anhängsel oder "Linker", wie es z.B. das Einzelketten-TZR - Konzept vorsieht. Zudem sind die Punktmutanten nahezu identisch zu den Wildtyp-Ketten, die bisher die größte funktionelle Wirksamkeit haben. Alle bisher und künftig entwickelten TAA-spezifischen TZR, ob murinen oder wahrscheinlich auch humanen Ursprungs, die künftig in der adoptiven Immuntherapie durch Gentransfer in humane T-Zellen von Tumorpatienten verwendet werden sollen, können mit geringem Aufwand mit diesen Mutationen ausgestattet werden. Der vorgestellte Ansatz könnte somit eine weite Verbreitung in der klinischen Applikation finden (Bolhuis et al., 1998; Cavazzana-Calvo et al., 2000).

In einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle zunächst eingeführte Aminosäure weiter geeignet chemisch modifiziert. Weitere Mutationen können auch nicht-chemisch eingeführt werden, so zum Beispiel durch

gentechnisch hergestellte Punktmutationen aus "phage display", um dadurch eine räumlich hervorstehende Gruppe oder eine räumlich zurückgesetzte Gruppe einzuführen. Dies bedeutet, daß zunächst eine Aminosäure eingeführt wird, die dann als Ausgangsbasis für die letztendlich vorhandene vorstehende Gruppe dient. Geeignete Modifikationen sind somit Aminosäurederivate, die durch chemische Mittel verändert wurden, wie zum Beispiel Methylierung (z. B.  $\alpha$ -Methylvalin), Amidierung, insbesondere der C-terminalen Aminosäure durch ein Alkylamin (z. B. Ethylamin, Ethanolamin und Ethylendiamin) und Veränderungen einer Aminosäureseitenkette, wie zum Beispiel Acylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. Andere Aminosäuren, die in die Kette inkorporiert werden können, schließen jede der D-Aminosäuren ein, die den 20 L-Aminosäuren, die gewöhnlich in Proteinen gefunden werden, entsprechen oder Iminioaminosäuren, seltene Aminosäuren, wie zum Beispiel Hydroxylysin oder nicht-Proteinaminosäuren, wie zum Beispiel Homoserin und Ornithin. Eine modifizierte Kette kann eines oder mehrerer dieser Derivate und D-Aminosäuren aufweisen. Die Kette kann durch chemische Verfahren synthetisiert werden, insbesondere unter der Verwendung eines automatisierten Peptid-Synthesizers oder durch rekombinante Verfahren hergestellt werden. Modifikationen des C-Terminus schließen Esterifizierung und Lactonbildung ein. N-terminale Modifikationen schließen Acetylierung, Acylierung, Alkylierung, Pegylierung, Myristylierung und ähnliches ein.

Üblicherweise werden jedoch mit dem erfindungsgemäßen Verfahren durch die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführten Aminosäuren die räumlich hervorstehenden, bevorzugt geladenen und/oder polaren Gruppen oder die räumlich zurückgesetzten, bevorzugt entgegengesetzt geladenen und/oder polaren Gruppen direkt zur Verfügung gestellt, ohne daß eine weitere Modifikation erforderlich ist. Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugtes Mutageneseverfahren bewirkt einen Austausch der Aminosäuren der ersten mit der zweiten Kette oder umgekehrt, wobei die durch die Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführten Aminosäuren so gewählt sind, daß ein wechselseitiger Austausch der Aminosäuren der an den Oberflächen der wechselwirkenden Ketten des TZR erreicht wird.

Als räumlich zurückgesetzte, bevorzugt geladene und/oder polare Gruppe soll im Sinne der vorliegenden Erfindung jede chemisch an der jeweils zu mutierenden Kette angebrachte chemische Gruppe verstanden werden, die räumlich weniger Platz einnimmt, als deren entsprechende vorher anwesende Gruppe und bevorzugt eine ganze bzw. den Bruchteil einer ganzen Ladungseinheit trägt. Es wird eine zur räumlich vorstehenden geladenen und/oder

polaren Gruppe entgegengesetzte Ladung eingeführt, entweder in der zurückversetzten Gruppe selbst durch Einführung einer Ladung oder aber durch den Wegfall einer Ladung in der betreffenden Gruppe wird die Nettoladung des die räumlich vorstehende geladene und/oder polare Gruppe umgebenden Käfigs umgekehrt (Figur 11). So kann die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführte Aminosäure, die gegenüber der Ausgangssequenz eine räumlich zurückgesetzte Gruppe einführt ausgewählt sein aus Glyzin, Serin, Threonin, Alanin, ohne darauf begrenzt zu sein. Serin und Threonin sind hierbei diejenigen zurückversetzten Gruppen, die selbst eine Partialladung tragen. Die Verwendung von Glyzin und Alanin impliziert die Betonung der verbleibenden Nettoladung des umgebenden Käfigs (z.B. Partialladungen der Peptidbindungen im Protein-Rückgrat). Ähnlich soll als räumlich vorstehende Gruppe im Sinne der vorliegenden Erfindung jede chemisch an der jeweils zu mutierenden Kette angebrachte chemische Gruppe verstanden werden, die räumlich mehr Platz einnimmt, als deren entsprechende vorher anwesende Gruppe und bevorzugt eine ganze bzw. den Bruchteil einer ganzen Ladungseinheit trägt. So kann die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführte Aminosäure, die gegenüber der Ausgangssequenz eine räumlich vorstehende Gruppe einführt, ausgewählt sein aus Lysin, Arginin, Histidin, Cystein, Glutamin, Glutamat und Tyrosin, ohne darauf beschränkt zu sein.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden in einem erfindungsgemäßen Verfahren mindestens zwei Oberflächen einer TZR-Kette gleichzeitig einer Mutagenese unterzogen. Dadurch kann mittels der Akkumulierung von mehreren Mutationen unter Umständen eine weiter gesteuerte Paarungseigenschaft des entsprechenden TZR erreicht werden, so zum Beispiel eine energetisch stärkere oder weniger starke Paarungskinetik, verglichen mit dem nicht modifizierten Zustand. Ein Verfahren zur Optimierung von Wechselwirkungen mehrerer Oberflächen stellt das "phage-display"-Verfahren dar.

Gemäß einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren können die entsprechend in Wechselwirkung stehenden Oberflächen in den variablen Domänen der TZR-Ketten lokalisiert sein. Die entsprechend in Wechselwirkung stehenden Oberflächen können jedoch auch in den konstanten Domänen der TZR-Ketten lokalisiert sein. Die Lokalisierung dieser Modifikationen hängt u.a. von der erwünschten Spezifizierung des jeweiligen TZR und dessen spezifischen Interaktionen ab.

So können gemäß einem besonderen erfindungsgemäßen Verfahren die zu mutierenden Domänen der TZR-Ketten ausgewählt sein aus Säugetier-, und dabei insbesondere aus menschlichen und/oder Maus-Domänen. Besonders bevorzugt ist dabei eine Mutagenese gemäß der vorliegenden Erfindung, wobei die rationale Mutagenese der TZR-Ketten gleichzeitig zu einer Humanisierung des TZR führt. Diese Mutagenese führt somit u.a. zu einer verbesserten Verträglichkeit des TZR.

Die vorliegende Erfindung weist somit im wesentlichen drei Komponenten auf:

- a) Der vom "knob hole" - Modell unabhängige Ansatz über große sterische Gruppen Ladung in das Innere der komplementären Kette einzubringen und durch kleine sterische Gruppen selbst oder durch den Wegfall geladener Gruppen zu einer Ladungskompensierung der eingebrachten Ladung zu gelangen. Dies ist ein strikt 2-parametrischer Ansatz. Hierbei wurde erstmals versucht, dieses Modell auf die Kontaktfläche zwischen den heterodimeren Ketten eines monovalenten TZR anzuwenden, wohingegen bisher bei Antikörpern diese auf die Kontaktfläche zwischen den schweren Ketten eines bivalent strukturierten Antikörpers bezogen wurde.
- b) Das experimentell neue an der vorliegenden Erfindung ist, ein Aminosäurepaar im TZR zu bestimmen, für das das beschriebene Modell anwendbar ist ( $\alpha$ TZR/Gly<sup>192</sup> und  $\beta$ TZR/Arg<sup>208</sup> des MDM2(81-88)-spezifischen TZR, Figur 5) und die Qualität des Austausches festzulegen (<sup>Arg208</sup>Gly und <sup>Gly192</sup>Arg). Es handelt sich um eine 1:1 Inversion der vorgefundenen sterischen und Ladungs-abhängigen Gegebenheiten und entspricht dem Übergang von Zustand I (Wildtyp) zu Zustand II (1 Mutation/Kette) der Figur 11 bzw. 2: Die eingebrachte positive Ladung des Arginin wird durch die verbliebenen Carbonyle des Polypeptidfadens der komplementären Kette kompensiert. Ein weiter Indikator für eine zum Wildtyp vergleichbare Ladungsneutralisation ist die durch Proteinstrukturen-Datenbank unterstützte Modellierbarkeit von Wasserstoffbrücken zwischen der Guanidinium-Gruppe des Arginin und den Hauptketten-Carbonylen sowohl für Zustand I als auch II für die Kristallstruktur eines ebenfalls murinen TZR (1tcr.pdb der Figur6).
- c) Das hier beispielhaft zu bestimmende Aminosäurepaar sollte so gewählt werden, daß es zum einen auf alle murinen TZR zu verallgemeinern war, um künftige, für andere TAA-spezifische murine TZR ebenso mit diesen Mutationen ausstatten zu können,



und zum anderen auch auf humane TZR erweitert werden konnte. Es wurde die konstante Domäne gewählt, da hier hinreichende Homologie zwischen humanen und murinen TZR besteht, um davon auszugehen, daß die gewählten Mutationen einen vergleichbar detrimentalen Effekt für hybride Hu/Mu TZR haben, wie es in der vorliegenden Erfindung für murine "hybride" TZR stellvertretend gezeigt wurde.

Es ist zu berücksichtigen, daß durchaus andere Aminosäureaustausche an der betreffenden Position einen vergleichbaren Effekt aufweisen könnten. Ferner ist eine Optimierung durch weitere, kumulative Austausche in der Umgebung der betreffenden Punktmutationen denkbar.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren, wobei als alpha-Kette und beta-Kette die alpha- und beta-Ketten eines MDM2(81-88)-spezifischen TZR verwendet werden und wobei das Gly<sub>192</sub> der konstanten Region der alpha-Kette und das Arg<sub>208</sub> der konstanten Region der beta-Kette gegen Arg<sub>192</sub> in der konstanten Region der alpha-Kette und gegen Gly<sub>208</sub> in der konstanten Region der beta-Kette ausgetauscht werden. Anhand dieses TZR konnte das erfindungsgemäße Prinzip erstmals erfolgreich angewendet werden.

Bevorzugt ist weiterhin ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei als Transfektionssystem ein retroviraler Vektor, insbesondere pBullet verwendet wird. In den Vektoren können auch IRES-Elemente verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine mutierte erste (alpha-) oder zweite (beta-) Kette eines TZR, die nach einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wird. Weiter besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäß mutierter TZR, insbesondere ein mutierter MDM2(81-88)-spezifischer TZR, wobei dieser mindestens eine mutierte alpha- und beta-Kette aufweist. Dieser mutierte TZR gemäß der vorliegenden Erfindung kann auch in Form eines Fusionsproteins, umfassend die erfindungsgemäß modifizierten Polypeptide oder Teile davon vorliegen. Das Fusionsprotein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es die  $\zeta$ -Region von CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die  $\zeta$ -Region von humanem CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Fusionsprotein die  $\zeta$ -Kette des CD3-Komplexes oder ITAM-Motive der  $\zeta$ -Kette oder Teile davon umfassen, insbesondere die  $\zeta$ -Kette von humanem CD3 oder Teile davon. Das Fusionsprotein kann weiterhin dadurch

gekennzeichnet sein, daß es CD8 $\alpha$  oder das Lck-Bindungsmotiv von CD8 $\alpha$  umfaßt oder Teile davon, insbesondere von humanem CD8 $\alpha$ .

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine isolierte Nukleinsäure, die eine für eine mutierte erste (z.B. alpha-) oder zweite (z.B. beta-) Kette eines erfindungsgemäßen TZR kodierende Sequenz umfaßt. Diese erfindungsgemäße Nukleinsäure kann eine DNA, RNA, PNA (Peptide nucleic acid) oder p-NA (Pyranosyl nucleic acid), vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 18 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden sein. Die Nukleinsäure kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist. Sie kann auch in Form ihrer antisense-Sequenz vorliegen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft auch ein DNA- oder RNA-Vektormolekül, das mindestens eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäure(n) umfaßt und das in Zellen exprimierbar ist. Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak Konsensus Sequenz (Kozak, 1987, Nucleic. Acids Res. 15:8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von anti-sense Oligonukleotiden (Zheng und Kemeny, 1995, Clin. Exp. Immunol. 100:380-2) und/oder Ribozymen (Amarzguioui, et al. 1998, Cell. Mol. Life Sci. 54:1175-202; Vaish, et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26:5237-42; Persidis, 1997, Nat. Biotechnol. 15:921-2). Mit anti-sense Oligonukleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verringern und/oder die Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl in vivo als auch in vitro verringert werden. Oligonukleotide können sich daher als Therapeutikum eignen. Diese Strategie eignet sich beispielsweise auch für Haut, epidermale und dermale Zellen, insbesondere, wenn die antisense Oligonukleotide mit Liposomen komplexiert werden (Smyth et al., 1997, J. Invest. Dermatol. 108:523-6; White et al., 1999, J. Invest. Dermatol. 112:699-705). Für die Verwendung als Sonde oder als "antisense" Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Nukleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nukleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure beispielsweise chemisch anhand der beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584).

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonukleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nukleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nukleinsäure in der Zelle beibehalten wird (WO 95/11910; Macadam et al., 1998, WO 98/37240; Reese et al., 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehreren Internukleotid-Phosphorgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide, erhalten werden.

Geeignete modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990 Chem. Rev. 90, 544) zusammengefaßt (WO 95/11910; Macadam et al., 1998, WO 98/37240; Reese et al., 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder Nicht-Phosphorbrücken in einer Nukleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidatbrücken und/oder Thioetherbrücken enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression", BioTechniques Vol. 7, No. 9, p 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor T-Zell spezifische regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. *Baculovirus*-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met 25, GAL 1 oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674-2682; Mumberg, supra), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugetierzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, CMV-LTR-Hybride, SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) Nature 214, 228-232) und weitere virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Ein Beispiel für ein regulierbares Element, das eine regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglicht, ist der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al. (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die T-Zell spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in diesen Zelltypen exprimiert werden.

Beispiele für regulierbare Elemente, die Zellzyklus-spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren folgender Gene: *cdc25*, Cyclin A, Cyclin E, *cdc2*, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker J. und Müller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6). Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolischspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glukosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zur Transfektion einer Wirtszelle verwendet werden, bei der es sich bevorzugterweise um eine T-Zelle handelt. Besonders bevorzugt ist eine Wirtszelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie auf ihrer Oberfläche ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Fusionsprotein exprimiert. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids zur Diagnose und/oder Behandlung von mit Onkoproteinen in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen in einer geeigneten Wirtszelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure auf geeignete Weise exprimiert wird.

Das Polypeptid wird so beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DHS, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzelllinien, z. B. von *Spodoptera frugiperda*, oder die tierischen Zellen COS, Vero, 293, HaCaT, und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transduktion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors oder Partikels vorliegen. Als virale Vektoren oder Partikel eignen sich hierbei besonders: Baculoviren, Vakziniaviren, Retroviren, Adenoviren,

adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht-virale Träger eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder poly-Lysin konjugierte DNA.

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Weijtens et al. "A retroviral vector system ,STITCH'; in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T-lymphocytes", Gene Therapy (1998) 5,1995-1203).

Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide *in vivo* zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten *ex vivo* mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der *de novo* eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Jüngst wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1- Krankheit bei Neugeborenen erzielt, in dem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden nicht-funktionellen mutierten Variante des  $\gamma$ -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Weiterhin besteht die Möglichkeit den Gentransfer *in vivo* durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden.

Retrovirale Vektorsysteme schaffen die Voraussetzung für eine langhaltende Expression des Transgens durch die stabile, aber ungerichtete Integration in das Wirtsgenom. Vektoren der jüngeren Generation besitzen keine irrelevanten und potentiell immunogenen Proteine, des weiteren gibt es keine vorbestehende Immunität des Empfängers gegenüber dem Vektor. Retroviren enthalten ein RNA-Genom, das in eine Lipidhülle verpackt ist, die aus Teilen der Wirtszellmembran und Virusproteinen besteht. Zur Expression viraler Gene wird das RNS-Genom revers transkribiert und mit dem Enzym Integrase in die Zielzell-DNS integriert. Diese kann daraufhin von der infizierten Zelle transkribiert und translatiert werden, wodurch virale Bestandteile entstehen, die sich zu Retroviren zusammenfügen. RNS wird ausschließlich dann in die neu entstandenen Viren eingefügt. Das Genom der Retroviren besitzt drei essentielle Gene: *gag*, das für virale Strukturproteine, sogenannte gruppenspezifische Antigene kodiert, *pol* für Enzyme wie Reverse Transkriptase und Integrase und *env* für das Hüllprotein ("envelope"), das für die Bindung des wirtsspezifischen Rezeptors verantwortlich ist. Die Produktion der replikationsinkompetenten Viren findet nach Transfektion in sogenannten Verpackungszelllinien statt, die zusätzlich mit den *gag/pol*-kodierenden Genen ausgestattet wurden und diese "in trans" exprimieren und somit die Ausbildung replikationsinkompetenter (d.h. *gag/pol*-deletierter) transgener Viruspartikel komplementieren. Eine Alternative ist die Cotransfektion der essentiellen Virusgene, wobei nur der das Transgen enthaltende Vektor das Verpackungssignal trägt.

Die Separation dieser Gene ermöglicht einerseits die beliebige Kombination des *gal/pol*-Leserahmens mit aus verschiedenen Stämmen gewonnenen *env*-Leserahmen, wodurch Pseudotypen mit verändertem Wirtstropismus entstehen, andererseits kann dadurch die Bildung replikationskompetenter Viren innerhalb von Verpackungszellen drastisch reduziert werden. Das aus "gibbon ape leukemia virus" (GALV) abgeleitete Hüllprotein, das im "stitch" bzw. "bullet"-Vektorsystem Verwendung findet, ist in der Lage humane Zellen zu transduzieren und ist in der Verpackungszelllinie PG13 mit amphotropen Wirtsbereich etabliert (Miller et al., 1991). Zusätzlich wird die Sicherheit durch selektive Deletion von nicht-essentiellen Virussequenzen zur Verhinderung einer homologen Rekombination und somit der Produktion replikationskompetenter Partikel erhöht.

Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst-integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z.B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle

eingeschleußt werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst, 1995, Hum. Mol. Genet. 4: 2279-85). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. (1999) Gene Therapy 6, 282; Brandén et al. (1999) Nature Biotech. 17, 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler et al. (1997) Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann (1990) supra). Eine andere besonders geeignete Form von gentherapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, J. Invest. Dermatol., 112:775-81).

Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann (Jackson, R. J. (1993) Cell 74, 9-14 und Palmiter, R. D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 478-482).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Wirtszelle, die ein DNA- oder RNA-Vektormolekül gemäß der Erfindung enthält. Diese kann insbesondere eine T-Zelle sein, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen sein, Beispiele für prokaryotische Wirtszellen sind *E. coli* und für eukaryotische Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder Insektenzellen.



Ein weiterer Aspekt betrifft somit eine rekombinante T-Zelle, die mindestens einen mutierten TZR gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert. Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine transgene T-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt. Verfahren zur Transformation oder Transduktion von Wirtszellen und/oder Stammzellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen zum Beispiel Elektroporation oder Mikroinjektion. Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine patienteneigene T-Zelle, die nach der Entnahme mit einem erfindungsgemäßen Genkonstrukt transfiziert wird. Erfindungsgemäße Wirtszellen können insbesondere dadurch erhalten werden, daß dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8<sup>+</sup>-T-Zellen entnommen werden, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden, um so erfindungsgemäße Wirtszellen zu erhalten. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten reimplantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL" J. Immunol., 2000, 164:3705-3712) beschriebenen Verfahren unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und  $\gamma$ -IFN.

Die erfindungsgemäß modifizierten (Poly)peptide und deren Derivate können zum Beispiel auch zur aktiven und/oder passiven Immunisierung von Patienten mit Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, die zum Beispiel mit MDM2 in Zusammenhang stehen, eingesetzt werden. Ein besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit eine Verwendung bei der eine Krebserkrankung behandelt wird, insbesondere eine Krebserkrankung, die mit einer veränderten Expression von MDM2 in Zusammenhang steht, um so die Induktion, Erzeugung und Zunahme vom Onkogen-spezifischen, z.B. MDM2-spezifischen ZTL zu erreichen und die Tumor- und Leukämiezellen der betreffenden Patienten spezifisch abzutöten. Solche Erkrankungen umfassen zum Beispiel solide Tumorerkrankungen, lymphohämatopoetische Neoplasien, maligne hämatologische Erkrankungen, auch in Form eines multiplen Myeloms (oder Plastozytoms), eines histiozytischen Lymphoms und eines CML-Blastenschubs. Damit zusammenhängende TAAs, gegen die entsprechende TZR entwickelt werden können, sind zum Beispiel p53, Her-2/neu, Ras, Tyrosinase, MART, Gp100, MAGE, BAGE, MUC-1, CD45, CD19 und PRDI-BF1.

Ein besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit auch eine Zusammensetzung, insbesondere pharmazeutische Zusammensetzung, die eine rekombinante T-Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung. Bevorzugt ist weiterhin die Verwendung einer mutierten alpha- oder beta-Kette eines TZR gemäß der vorliegenden Erfindung, eines mutierten TZR gemäß der vorliegenden Erfindung und/oder einer rekombinanten T-Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung zur Herstellung von Therapeutika und/oder Prophylaktika zur Behandlung von Krebserkrankungen. Bei einer besonders bevorzugten Art der Behandlung wird dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8<sup>+</sup>-T-Zellen entnommen, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transduziert oder transfiziert werden. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten re-implantiert werden. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann weiterhin geeignete Zusatz- und Hilfsstoffe enthalten.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel zur Indikation und Therapie von mit Onkoprotein-Protein assoziierten Erkrankungen, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels zur Behandlung von mit Onkoprotein-Protein assoziierten Erkrankungen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert wird. Als Therapeutika und/oder Prophylaktika kommen insbesondere Impfstoffe, rekombinante Partikel oder Injektionen oder Infusionslösungen in Betracht, die als Wirkstoff (a) das erfindungsgemäße TZR-Rezeptor Polypeptid und/oder seine Derivate und/oder (b) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und/oder (c) *in vitro* oder *ex vivo* erzeugte T-Lymphozyten, die einen spezifisch mutierten gegen Onkoprotein gerichteten TZR enthalten.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel und/oder rekombinanter Partikel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen bzw. Goldpartikeln komplexierter Form enthält. Der pharmazeutische Träger ist beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ca. 6,0-8,0, vorzugsweise von ca. 6,8-7,8. Insbesondere von ca. 7,4 und/oder einer

Osmolarität von ca. 200-400 milliosmol/Liter, vorzugsweise von ca. 290-310 milliosmol/Liter. Zusätzlich kann der pharmazeutische Träger geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

Der Begriff "kodierende Nukleinsäure" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die für ein isolierbares bioaktives erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Vorläufer kodiert. Das Polypeptid kann durch eine Sequenz in voller Länge oder jeden Teil der kodierenden Sequenz kodiert werden, solange die spezifische, beispielsweise enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

Es ist bekannt, daß kleine Veränderungen in der Sequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorhanden sein können, zum Beispiel durch die Degenerierung des genetischen Codes, oder daß nicht translatierte Sequenzen am 5' und/oder 3'-Ende der Nukleinsäure angehängt sein können, ohne daß dessen Aktivität wesentlich verändert wird. Diese Erfindung umfaßt deshalb auch sogenannte "funktionelle Varianten" der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Mit dem Begriff "funktionelle Varianten" sind alle DNA-Sequenzen bezeichnet, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, die unter stringenten Bedingungen mit einer abgeleiteten Referenzsequenz oder Teilen davon, insbesondere der hypervariablen V(D)JC-Region, hybridisieren und eine zu dem entsprechenden erfindungsgemäßen Polypeptid ähnliche oder identische Aktivität aufweisen.

Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung bei 60°C in 2,5 x SSC-Puffer, gefolgt von mehreren Waschschritten bei 37°C in einer geringeren Pufferkonzentration erfolgt und stabil bleibt.

Unter dem Begriff "funktionelle Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Polypeptiden verwandt sind, d. h. Strukturmerkmale der Polypeptide aufweisen. Beispiele funktioneller Varianten sind die entsprechenden Polypeptide, die aus anderen Organismen als der Maus, also dem Menschen, bzw., vorzugsweise aus nicht-menschlichen Säugetieren wie z. B. Affen, Schweinen und Ratten stammen. Andere Beispiele funktioneller Varianten sind Polypeptide, die durch unterschiedliche Allele des Gens, in verschiedenen Individuen oder in verschiedenen Organen

eines Organismus kodiert werden. Von der vorliegenden Erfindung werden insbesondere auch funktionelle TZR-Varianten erfaßt, die das identische Epitop des MDM2-Polypeptids erkennen und eine spezifische T-Zell Antwort auslösen.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität, von ca. 70%, vorzugsweise ca. 80%, insbesondere ca. 90%, vor allem ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 6 und/oder zu anhand der Peptidsequenzen abgeleiteten DNA Sequenzen aufweisen. Darunter zählen auch Additionen, Inversionen, Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder chemische/physikalische Modifikationen und/oder Austausch oder Teile des Polypeptids im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird.

Die Erfindung soll nun weiter anhand der beigegeführten Beispiele und Figuren erläutert werden, ohne durch diese eingeschränkt zu werden. Es zeigt:

SEQ. ID Nr. 1: die alpha-Kette des murinen TZR 1tcr (1TZR\_aTZR.pro),  
SEQ. ID Nr. 2: die alpha-Kette des murinen MDM2 TZR (Mu\_Wt\_aTZR\_MDM2.pro),  
SEQ. ID Nr. 3: die alpha-Kette des menschlichen TZR 1bd2 (1bd2\_aTCR.pro),  
SEQ. ID Nr. 4: die beta-Kette des murinen TZR 1tcr (1TZR\_bTZR.pro),  
SEQ. ID Nr. 5: die beta-Kette des murinen MDM2 TZR (Mu\_Wt\_bTZR\_MDM2.pro), und  
SEQ. ID Nr. 6: die beta-Kette des menschlichen TZR 1bd2 (1bd2\_bTCR.pro).

Figur 1 zeigt die Superposition des Protein-Rückgrats von Protein-Kristallstrukturen eines murinen H2-K<sup>b</sup>-restringierten (1tcr, Garcia et al, 1998) und eines humanen HLA-A2-restringierten (1bd2, Ding et al., 1998) T-Zell-Rezeptors. Der heterodimere humane TZR ist dunkelgrau ( $\alpha$ TZR) und hellgrau ( $\beta$ TZR) für die jeweiligen Ketten dargestellt; der murine TZR für die einzelnen Ketten insgesamt grau.

Figur 2 zeigt die Darstellung des Protein-Rückgrats von 1tcr mit ausschließlich denjenigen Seitenketten, die zu 1bd2 identisch sind. Die obere Graphik illustriert das Vorhandensein weniger identischer Reste im Kontaktbereich der variablen Domänen (V $\alpha$ , V $\beta$ ) der beiden Ketten. Die untere Graphik ist zur oberen um die Achse in der Papierebene derart gedreht, so

daß diese das zahlreiche Vorhandensein identischer Aminosäuren im Kontaktbereich der konstanten Domänen ( $C\alpha$ ,  $C\beta$ ) dokumentiert.

Figur 3 zeigt die Darstellung relevanter MDM2(81-88)-spezifischer TZR - Konstrukte, von denen im vorgestellten murinen Modell die jeweiligen Wildtyp-Ketten (Wt) des Mu Wt TZR MDM2 entsprechend der Graphik mutiert (Mut) wurden und nach retroviralem Transfer in humane T-Zellen kombiniert wurden. Die murinen variablen Domänen sind weiß, die konstanten Domänen sind grau schraffiert. Der partiell humanisierte TZR (Mu Chim TZR MDM2) besitzt eine enger gefaßte graue Schraffur in der konstanten Domäne. Unten ist ein Einzelketten-TZR abgebildet, dessen variable Domänen über einen  $(\text{GlyGlyGlyGlySer})_3$  - Linker verknüpft sind. Die Länge der Zylinder deuten die relevanten Aminosäurepositionen und deren sterische Größe an. Ein gelber Pfeil symbolisiert das Ausbleiben der Interaktion der Ketten aufgrund sterischer Behinderung (Mu  $\text{Muto}\alpha/\text{Wt}\beta$  TZR MDM2) bzw. des Fehlens von Interaktion (Mu  $\text{Wto}\alpha/\text{Mut}\beta$  TZR MDM2) der respektiven Aminosäurepaare.

Figur 4 zeigt den Aminosäure-Sequenzvergleich des murinen TZR 1tcr (1TZR\_aTZR.pro bzw. 1TZR\_bTZR.pro), für den Strukturdaten vorlagen, mit den MDM2-spezifischen TZR (Mu\_Wt\_aTZR\_MDM2.pro bzw. Mu\_Wt\_bTZR\_MDM2.pro) und dem humanen TZR 1bd2, für den ebenfalls Strukturdaten vorliegen. Die Höhe der Balken deuten das Ausmaß der gefundenen Identität an den jeweiligen Positionen an. Aus diesem geht hervor, daß die unmittelbar die mutierten Aminosäuren umgebenden und größtenteils dazu interagierenden Aminosäuren weitgehend zwischen Mensch und Maus konserviert sind. Die Analyse der Kristall-Strukturen zeigt unwesentliche Unterschiede. Figur 4a:  $\alpha$ -Ketten-Vergleich; Figur 4b:  $\beta$ -Ketten-Vergleich.

Figur 5 zeigt die Angabe des Aminosäurepaars im strukturellen Gesamtkontext von 1tcr, das dem mutierten Aminosäurepaar  $\text{Gly}^{192}/\text{Arg}^{208}$  des MDM2-spezifischen TZR entspricht. Die Aminosäuren liegen mittig in verdrehten, um sich gewundenen und gegenseitig aufeinander ausgerichteten  $\beta$ -Faltblätter beider Ketten innerhalb der konstanten Domänen. Zur Orientierung sind die relevanten CDR3-Schleifen der variablen Domänen, die das Peptid-Antigen des 1tcr erkennen, in einem abweichenden Grauton gefärbt: das betroffene Aminosäurepaar liegt weitab von der Region, die für die Bindung des MHC-Peptid-Komplexes verantwortlich ist.

Figur 6 zeigt die räumliche Darstellung des Wildtyp-Aminosäurepaars Gly<sup>179</sup>/Arg<sup>195</sup> (Figur 6a) und des mutierten Aminosäurepaars Arg<sup>179</sup>/Gly<sup>195</sup> (Figur 6b) des 1tcr.pdb, wie es sich für letzteres nach Strukturdaten-unterstütztem Design darstellt. Figur 6a beinhaltet diejenigen Aminosäuren der zentralen  $\beta$ -Faltblätter mit großen sterischen Seitenketten, die Figur 6b hingegen diejenigen Aminosäuren in einer sphärischen Region von 5 Angstrom Durchmesser um das C $\alpha$  des am Bildschirm mutierten Arg<sup>179</sup> unter Wegfall derjenigen Seitenketten, die von der Kontaktregion der Ketten wegzeigen (aus Gründen der Übersicht). Es wurde eine Konformere gewählt, die keine beeinträchtigende Interaktion mit den benachbarten Seitenketten besitzt. Die gestreckte Konformation erlaubt die Ausbildung einer H-Brücke zum gegenüberliegenden Hauptketten-Sauerstoff der  $\beta$ -Kette nahezu analog zu den Gegebenheiten im Wildtyp (Fig 6a).

Figur 7 zeigt die FACS - Analyse der humanen transduzierten T-Zellen, die jeweils mit den unterschiedlichen Kombinationen der unter Figur 3 beschriebenen TZR-Konstrukte versehen wurden. Dargestellt ist eine 2-fach - Färbung von v $\beta$ 6-FITC und CD8-PC5: nur CD8-positive, transduzierte T-Zellen zeigen die gewünschte cytotoxische Effektorfunktion. Die v $\beta$ 6 - Anfärbung erlaubt den Nachweis der  $\beta$ -Kette, nicht der  $\alpha$ -Kette.

Figur 8 zeigt die FACS - Analyse der humanen transduzierten T-Zellen, die jeweils mit den unterschiedlichen Kombinationen der unter Figur 3 beschriebenen TZR-Konstrukte versehen wurden. Dargestellt ist eine 2-fach - Färbung von TetMDM2-PE und CD4-FITC: die Tetrameren-Anfärbung erlaubt den Nachweis des funktionellen, heterodimeren  $\alpha\beta$ TZR, somit indirekt den Nachweis der  $\alpha$ -Kette. Nur CD8-positive T-Zellen lassen sich anfärben, da das Tetramer im Fall moderat bis hochaffin bindender TZR nur CD8-abhängig bindet.

Figur 9 zeigt den Cytotoxizitäts-Test (Stanislawski & Voss et al, 2001) mit den unter Figur 3 gezeigten kombinierten Doppel-Ketten TZR: TAP-defiziente T2 wurden exogen mit den angegebenen MDM2(81-88)-Peptid-Konzentrationen beladen und auf Erkennung durch die transduzierten T-Zellen getestet: das Ausmaß der Lyse spiegelt sich in der Quantität des zellulär aufgenommen und durch Lyse freigesetzten <sup>51</sup>Cr wieder. Als irrelevantes Peptid diente ein gp100-abgeleitetes Peptid. Es sind sowohl die "Effektor : Target" - Ratios angegeben, als auch die korrigierten CD8<sup>+</sup>v $\beta$ 6<sup>+</sup>-Ratios, da dieses zwischen den unterschiedlichen Transduktions-Ansätzen schwankte.

Figur 10 zeigt den Cytotoxizitäts-Test (Stanislowski & Voss et al, 2001) mit den unter Figur 3 gezeigten kombinierten Doppel-Ketten TZR: als "Targets" dienten HLA-A2-positive Leukämie-Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)), die MDM2 überexprimieren und das MDM2(81-88)-Peptid prozessieren. Als Negativ-Kontrolle diente die A2-negative Leukämie-Zelllinie UocB1 und die MDM2-negative Zelllinie Saos2. Eine MDM2-Transfektante von Saos2, Saos2 cl6, wurde ebenfalls spezifisch erkannt.

Figur 11 zeigt die verschiedenen Möglichkeiten der Inversion der sterischen Verhältnisse, der Ladungen oder beidem, gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

### Beispiele

Es sollten Punktmutanten (Mut) der murinen Wildtyp-TZR (Wt) bestimmt werden, die das oben beschriebene "knob-hole"-Modell erfüllen: Kettenpaarung nur derjenigen TZR-Ketten sollte eintreten, die jeweils eine der sterisch invertierten Aminosäurepartner tragen, wohin gegen die Kombination aus Wildtyp und mutierter Kette in beiden denkbaren Orientierungen beeinträchtigt sein sollte (Figur 3). Zudem mußten die kombinierten TZR nach Einschleusen in humane T-Zellen im Hinblick auf ihre strukturelle Avidität, d.h. ihre strukturelle Integrität und in Hinblick auf ihre funktionelle Avidität, d.h. das Aufrechterhalten der Peptid-abhängigen Effektor-Funktion, getestet werden (Bullock et al., 2001). Als Modellsystem dienen die oben beschriebenen und in unserem Labor identifizierten murinen MDM2(81-88)-spezifischen T-Zell-Rezeptoren, deren Aminosäuresequenz der konstanten Domänen nahezu identisch zu dem murinen TZR 1tcr.pdb ist, für den Strukturdaten vorliegen (Figur 4a/b, Garcia et al., 1998) und der in den variablen Domänen eine hohe Homologie zu diesen aufweist. MDM2 ist ein humanes, regulatorisches Proto-Onkoprotein, das die Expression des Tumorsuppressor-Proteins p53 gegenreguliert (Stanislowski & Voss et al., 2001).

Die Art und Weise der Auswahl der Punktmutanten erfolgte nach Studium publizierter TZR-Kristallstrukturen und dem Homologievergleich muriner und humaner Sequenzen. Die Punktmutanten wurden dann in die dem Menschen ähnlichen murinen TZR eingeführt und experimentell funktionell getestet. Aus dem Homologievergleich zu humanen Sequenzen kann abgeleitet werden, daß die strukturellen Gegebenheiten in humanen TZRs in mittelbarer Umgebung der Aminosäureaustausche nahezu identisch sind und damit eine Paarung

"mutierte murine Kette mit humaner Wildtyp-Kette" in der Konfiguration " $\alpha$ TZR -  $\beta$ TZR" oder " $\beta$ TZR -  $\alpha$ TZR" ebenfalls vermindert sein muß.

Die bisherigen Punktmutanten sind noch nicht absolut funktionell, behindern merkbar die Ausbildung ungewünschter Paarungen. Diese Aminosäureaustausche folgen dem allgemeinen "knob-hole" - Modell, das besagt, die Größenverhältnisse interagierender Aminosäuren zu invertieren, um eine kettenspezifische Interaktion einzuführen. Weitere Mutationen können in den bereits generierten Ketten angelegt werden, um die Spezifität weiter zu erhöhen. Dieser Aspekt ist ebenfalls vom Umfang der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

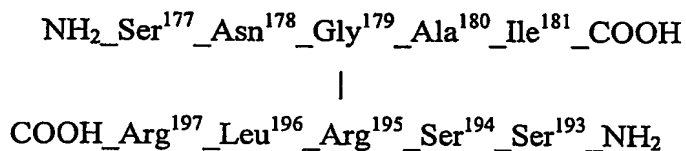
Die Auswahl der Punktmutanten wurde derart getroffen, daß diese zumindest für verschiedene murine TZR unterschiedlicher Peptid-Spezifität generalisierbar waren. Zudem sind diese Punktmutanten auch auf humane TZR anwendbar, da die murinen TZR in einem parallelen Projekt bei Aufrechterhaltung der Peptid-abhängigen Effektor-Funktion maximal humanisiert werden sollten, um Immunreaktionen gegen die exogenen TZR zu vermeiden. Hierfür sollten präferentiell identische Aminosäuren gegenüber homologen Aminosäuren ausgesucht werden. Ein Sequenzvergleich mehrerer muriner und humaner TZR-Sequenzen zeigte eine überaus hohe Homologie in der konstanten Domäne, wohingegen die variable Domäne nur wenig Homologien aufwies (Figur 4a/b). Es gibt zahlreiche Aminosäuren, die im Kontaktbereich der heterodimeren Ketten zwischen Mensch und Maus konserviert sind und individuell für die Aufgabenlösung verifiziert werden mußten (Figur 2). Als wesentliches Kriterium müssen die ausgewählten Aminosäuren in das "knob hole" -Modell integrierbar sein, d.h. eine Aminosäure mit einer entsprechend großen Seitenkette mußte mit einer kleinen Aminosäure der anderen Kette in Wechselwirkung treten. Hiefür spielte es *a priori* keine Rolle, in welcher der beiden Ketten sich die große Aminosäure befindet. Als große Aminosäuren kamen Tryptophan, Lysin, Arginin, Phenylalanin und Tyrosin in Betracht, als kleine insbesondere Glycin, Serin, und Alanin. Die direkt benachbarten Aminosäuren sollten sich im Fall einer potentiellen Inversion der sterischen Gegebenheiten am betreffenden Ort möglichst inert verhalten, d.h. keine ausgeprägte Interaktion, ob hydrophober oder geladener Natur, mit dem interagierenden Aminosäurepaar aufweisen.

Für das Studium muriner TZR-Strukturen wurde die Koordinaten-Datei des murinen TZR 1tcr.pdb (Garcia et al., 1998) aus der "Brookhaven Protein Data Bank" ([www.resb.org/pdb](http://www.resb.org/pdb))



geladen und mittels der Struktur-darstellenden Software "Swiss-PDBViewer" ([www.expasy.ch/spclbv](http://www.expasy.ch/spclbv)) visualisiert.

Als besonders attraktiv erwies sich folgende Position: das Arginin<sup>195</sup> des  $\beta$ TZR aus 1tcr.pdb wies in einer nahezu gestreckten all-trans-Konformation der Seitenkette in Richtung des  $\alpha$ TZR (Figur 5). Gegenüber der Guanidinium-Gruppe des Arg<sup>195</sup> befindet sich Gly<sup>179</sup> des  $\alpha$ TZR in einem idealen Van der Waals - Abstand. Die Aminosäuresequenz auf Seiten der  $\alpha$ -Kette um Gly<sup>179</sup> ist



Der gegenüberliegende  $\beta$ -Strang der  $\beta$ -Kette, der das Arg<sup>195</sup> beinhaltet, ist antiparallel und ca. um 30° zum  $\alpha$ -Ketten -  $\beta$ -Strang verdreht: hierdurch kommen die Seitenketten der benachbarten  $\beta$ -Stränge in räumliche Nähe zu dem interagierenden Aminosäurepaar. Die  $\beta$ -Ketten-Aminosäuresequenz an dieser Stelle ist identisch zwischen Mensch und Maus, die der  $\alpha$ -Kette ist weitgehend homolog: Gly<sup>179</sup> ist durch die ebenfalls kleine Aminosäure Serin im Menschen ersetzt, Ile<sup>181</sup> durch das homologe Valin. Die Sequenzen der auf gleicher Höhe zu den Gly<sup>179</sup>/Arg<sup>195</sup> benachbarten  $\beta$ -Stränge beider Ketten sind über eine Länge von 5 Aminosäuren zwischen Mensch und Maus identisch und damit auch die potentiellen Interaktionspartner unmittelbar um Gly<sup>179</sup>/Arg<sup>195</sup> (Figur 4a/b).

Für das Aminosäurepaar kommen allenfalls schwache hydrophobe Interaktionen benachbarter Seitenketten in Betracht. Die Kontaktfläche der Ketten an dieser Stelle ist nicht dicht gepackt: nur wenige langkettige Aminosäuren zeigen in Richtung der gegenüberliegenden Kette oder bieten großflächige hydrophobe Van der Waals-Kontakte. Dies betont um so mehr die strukturelle Bedeutung der hervorstehenden Seitenkette des Arg<sup>195</sup>. Das Aminosäurepaar ist mittig in einem verdrehten  $\beta$ -Faltblatt der teils um sich gewundenen konstanten Domänen der beiden Ketten lokalisiert (Figur 6a/b): jedes  $\beta$ -Faltblatt besteht aus vier  $\beta$ -Strängen, von denen jeweils ein mittlerer  $\beta$ -Strang eine der anvisierten Aminosäuren enthält. Jedes  $\beta$ -Faltblatt der einzelnen Ketten bildet für sich zahlreiche H-Brücken, aber über deren Aminosäure-Seitenketten keine zu der gegenüberliegenden Kette. Ausschließlich Arg<sup>195</sup> bildet über den terminalen Stickstoff der Guanidinium-Gruppe zwei H-Brücken zum gegenüberliegenden

Hauptketten-Sauerstoff und Seitenketten-Sauerstoff von Thr<sup>166</sup> der  $\alpha$ -Kette. Es bildet eine zentrale Brücke in einer ansonsten sowohl durch wenige Salzbrücken und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen als auch durch eine geringe Packung hydrophober Aminosäuren gekennzeichneten Kontaktregion. Am Rande dieser sich formierenden Höhle (Figur 6a) gibt es zahlreiche Kontakte zwischen den Ketten, liegen aber nicht vergleichbar günstig mitten in der Kontaktfläche der betreffenden gewundenen  $\beta$ -Faltblätter. Die gestreckte Konformation des Arg<sup>195</sup> als auch die geringe hydrophobe Packung ermöglichen eine Inversion der Aminosäuren, ohne die lokale Struktur wesentlich zu beeinträchtigen. Ein mutiertes Arg<sup>179</sup> des  $\alpha$ TZR wäre ebenso in der Lage, zumindest eine H-Brücke zum Hauptketten-Sauerstoff von Ser<sup>173</sup> des gegenüberliegenden  $\beta$ -Stranges des  $\beta$ TZR zu bilden ohne daß das mutierte Gly<sup>195</sup> irgendeine Behinderung böte (Figur 6b). Es erfolgt eine geringfügige positive Ladungsverschiebung der Guanidinium-Gruppe von der  $\alpha$ -Kette in Richtung der  $\beta$ -Kette. Die Aminosäuren müssen qualitativ nicht verändert werden, um vergleichbare sterische (d.h. ideale hydrophobe Abstände) und polare Verhältnisse (d.h. H-Brücken) zu generieren. Die zu Arg<sup>195</sup> und Gly<sup>179</sup> des 1tc1.pdb identischen Positionen im MDM2(81-88)-spezifischen TZR sind Arg<sup>208</sup> und Gly<sup>192</sup>. In humanen T-Zell-Rezeptoren ist das Arginin der  $\beta$ -Kette konserviert, wohingegen an die Stelle des Glycins der  $\alpha$ -Kette die ebenfalls kleine Aminosäure Serin getreten ist (1bd2; Figur 4). Eine Arbeit an mutierten bzw. trunkierten TZR belegt die Bedeutung der konstanten Domänen für die Kettenpaarung durch Coulomb-Kräfte zwischen geladenen Aminosäureresten, des Bereiches Ser<sup>188</sup>-Leu<sup>213</sup> der  $\beta$ -Kette, in dem die von den Erfindern beschriebene Punktmutante liegt (Li et al., 1996).

Die entsprechenden Mutationen wurden mit Hilfe des "Quikchange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis"-Kit (Stratagene) in die respektiven MDM2(81-88)-spezifischen TZR-Gene, die sich bereits individuell in dem retroviralen Vektor pBullet (Willemsen et al., 2000) befanden, eingeführt (Stanislowski & Voss et al., 2001).

Der adoptive Transfer in humane T-Zellen erfolgte prinzipiell wie es in Stanislowski & Voss et al (2001) beschrieben ist. Das Cotransfektionssystem (Weijtens et al., 1998), das eine Cotransfektion einzelner Plasmide mit jeweils einer Kette des heterodimeren TZR als Transgen kodierend vorsieht, ermöglichte die Kombination aller denkbaren Wildtyp und mutierten TZR-Ketten. Die Wildtyp TZR versus der in beiden Ketten mutierten TZR versus der in nur einer Kette mutierten TZR sollten strukturell über FACS-Analyse und funktionell über cytotoxische Lyse von antigenpräsentierenden Zellen (APC) als lysierbare Zielzellen

analysiert werden. Hierbei dienten modellhaft die in nur einer Kette mutierten, künftig "hybride" genannte TZR als die "unerwünschten" TZR-Kettenpaare aus mutierter exogener muriner  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette und der Wildtyp endogenen humanen  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ -Kette (Figur 3), wie es hypothetisch im Fall eines adoptiven Transfers in humane T-Zellen auftreten könnte. Dies konnte angenommen werden, da sowohl das strukturelle Rückgrat als auch die Aminosäuresequenzen humaner und muriner TZR in der konstanten Domäne stark konserviert sind und potentiell interagieren können und Mutationen einen vergleichbaren Effekt auf Kettenpaarung und Antigen-Erkennung ausüben. Die in den humanen T-Zellen vorliegenden endogenen TZR störten hierbei die Analyse verschiedener muriner TZR-Kombinationen nicht, da die Mutationen der murinen Ketten allenfalls eine gleichgerichtete Wirkung auf die Kettenpaarung zu dem humanen "Pendant" hätten. Zudem ist es von Bedeutung, diese Experimente in einem experimentellen Aufbau durchzuführen, das möglichst nahe an der klinischen Applikation liegt.

Um davon auszugehen, daß alle T-Zellen das Transgen beherbergen, wurden nach Transduktion die T-Zellen über G418 (Selektionsmarker für die  $\beta$ -Kette, über ein IRES-Element dem Transgen nachgeschaltet), als auch über Puromycin selektiert (Selektionsmarker für die  $\alpha$ -Kette). Somit überleben nur diejenigen T-Zellen, die sowohl die bicistronische mRNA aus  $\beta$ TZR-Transgen und G418-Marker als auch die bicistronische mRNA aus  $\alpha$ TZR und Puromycin bilden. Unterschiede in der FACS-Anfärbung rühren daher nicht von unterschiedlichen Transduktionseffizienzen der humanen T-Zellen her, sondern sind Ausdruck der jeweiligen TZR-Stabilität.

Die strukturelle Avidität als Ausdruck stabiler Expression der Wildtyp als auch der mutierten TZR wurde zum einen über die Subfamilienspezifische Anfärbung der  $\beta$ -Kette (vbeta6-FITC; Figur 7) als auch der TZR-Spezifitäts-unterscheidenden Anfärbung mittels MDM2(81-88)-spezifischer TZR-Tetramere (Klenerman et al., 2002, Figur 8) im Wege der FACS-Analyse untersucht. Die Tetramere wurden im Labor von Dr. Pedro Romero (Universität Lausanne, Schweiz) hergestellt und für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt.

Es zeichnete sich bereits in der v $\beta$ 6-Anfärbung ab, daß die "hybriden" TZR, Mu Muta/Wt $\beta$  TZR MDM2 und Mu Wt $\beta$ /Muta $\alpha$  TZR MDM2, mindestens ebenso instabil die  $\beta$ -Kette exprimierten wie es von einem partiell humanisierten TZR, Mu Chim TZR MDM2, bekannt war (Figur 7). Ein weiterer Indikator einer ausgeprägten TZR-Instabilität war die nahezu

vollständig fehlende Tetramer- Anfärbbarkeit (Figur 8). Die in beiden Ketten mutierten TZR, Mu Muto/Mutß TZR MDM2, wurden nahezu vergleichbar zu den murinen Wildtyp-Ketten, Mu Wt TZR MDM2, sowohl in der v $\beta$ 6- als auch der Tetramer-Anfärbung nachgewiesen.

Die Lysiseffizienz als Maß der funktionellen Avidität wurde im Chrom-Freisetzungstest oder auch Cytotoxizitätstest gemessen. Hierzu wurde die Zelllinie T2, die nicht in der Lage ist, endogen prozessierte Peptide auf MHC-Moleküle zu laden und die Komplexe an die Zelloberfläche zu transportieren, exogen mit dem MDM2(81-88)-Peptid konzentrationsabhängig beladen und in einer Peptidtitration die halbmaximale Lyse als Maß der Erkennung gemessen (Figur 9). Die unterschiedliche v $\beta$ 6- als auch CD8-Positivität der verschiedenen transduzierten T-Zell-Populationen wurde unter Angabe der CD8<sup>+</sup>v $\beta$ 6<sup>+</sup>:T - Verhältnissen zuzüglich zu den üblichen E:T (Effektor:Target)- Verhältnissen angegeben: Unterschiede in der Lysiseffizienz sind somit ein Spiegelbild der verschiedenen kombinierten TZR-Konstrukte unter Korrektur der beiden T-Zell-Phänotyp-Marker als Ausdruck der prozentualen Expressionsstärke des  $\beta$ TZR (v $\beta$ 6<sup>+</sup>) und der prozentualen Stärke der cytotoxischen T-Zell-Population (CD8<sup>+</sup>). Kongruent zu den Daten der strukturellen Avidität konnte aus den funktionellen Daten abgelesen werden, daß die "hybriden" TZR deutlich in der Lysiseffizienz im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt waren und auch noch schlechter als der chimäre, partiell humanisierte TZR waren, obwohl in diesem eine komplette Domäne (C $\alpha$  bzw. C $\beta$ ), und nicht nur eine Aminosäure wie in den "hybriden" TZR, ausgetauscht wurde. Der in beiden Ketten mutierte TZR, Muto/Mutß TZR MDM2, bewies nur leicht verschlechterte Lyseeigenschaften im Vergleich zum Wildtyp.

Diese quantitativen Unterschiede sollten nun daraufhin geprüft werden, ob es kritische halbmaximale Lysen, d.h. einen Schwellenwert gibt, ab denen Zielzellen, die endogen das betreffende Peptid präsentieren, erst erkannt werden. Hierzu wurden in einem Cytotoxizitätstest verschiedene Zielzellen überprüft (Figur 10): Saos2 dient hierbei als Negativkontrolle der MDM2-Expression, wohingegen Saos2 cl6 eine MDM2-Transfektante mit positiver MDM2(81-88)-Prozessierung darstellt. Die Leukämie-Zelllinie UocB1 ist HLA-A2-negativ und zeigt die MHC-Restriktion der transduzierten T-Zellen an. Die übrigen Leukämie-Zelllinien EU-3, BV-173 und IM-9 sind unterschiedlichen Ursprungs (ATCC, DSMZ) und belegen die Generalisierbarkeit der MDM2(81-88)-Erkennung durch die transduzierten, humanen T-Zellen. Auch hier konnte gezeigt werden, daß der in beiden Ketten mutierte TZR vergleichbar dem Wildtyp und besser als der chimäre TZR die endogenen

"Targets" erkennt. Obwohl die "hybriden" TZR die exogen beladene Zelllinie T2 bis zu 1 nM Peptid halbmaximal lysieren (Figur 9), erkennen diese die malignen Zelllinien nicht: offenbar ist die MDM2(81-88)-Peptid-Präsentation unter einen kritischen Wert gefallen, unter dem dieses nicht mehr erkannt wird. Saos2 cl6 wird schwach erkannt, was wahrscheinlich mit der heterologen, Promoter-getriebenen hohen Expression von MDM2 zu erklären ist.

Die Daten der strukturellen und funktionellen Avidität sind somit kongruent und belegen die Wirksamkeit der gewählten Punktmutanten in einem murinen TZR-Modell in humanen T-Zellen, um ungewünschtes "Pairing" heterodimerer "hybrider"  $\alpha\beta$ TZR deutlich zu beeinträchtigen.

#### **Transduktion humaner peripherer Blut Lymphozyten (PBLs)**

Zur Transduktion humaner peripherer T-Lymphozyten wurde ein funktionelles Derivat des pStitch-Systems (Weijtens et al., 1999) verwendet. Die zur Verpackung notwendigen retroviralen Gene werden über individuelle Plasmide im Wege einer Cotransfektion der Verpackungszelllinie 293T kodiert (Soneoka et al., 1995): pHit60 kodiert für die *gag-pol* - Struktur- und Polymerase - Gene aus dem Moloney murinen Leukämie Virus (MoMuLV), pColt-Galv für das *env* - Hüllprotein des "gibbon ape leukemia virus", das in der Lage ist, an den  $\text{Na}^+$ -Phosphat-Synporter Pit humaner Zellen zu binden und damit letztere zu transduzieren. Die chimären Viruspartikel besitzen somit einen amphotropen Pseudotyp und können verschiedene Säugerzellen, außer Maus, transduzieren.

#### **Transfektion der Verpackungszelllinie 293T**

Die isolierten bakteriellen Klone der in das pStitch-Derivat klonierten T-Zell-Rezeptor-Gene wurden über Plasmid-Präparationen, die eine Entfernung residueller Endotoxine versprechen (Qiagen, Produkt 12362), gereinigt und zu 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Die DNS wurde über die Calciumphosphat-Präzipitation transient in die Verpackungszelllinie 293T eingeführt (GiboBRL-Life Technologies, Produkt 18306-019). Hierbei werden im Rahmen der modifizierten T-Zell-Rezeptoren  $\alpha$ TZR und  $\beta$ TZR bis zu 80  $\mu\text{g}$  DNS eingesetzt:

20  $\mu\text{g}$   $\alpha$ TZR - Konstrukt

20  $\mu\text{g}$   $\beta$ TZR - Konstrukt

20  $\mu\text{g}$  pColt-Galv

20  $\mu\text{g}$  pHit 60

Im Fall von Einzelketten-TZRs werden 60 µg DNS eingesetzt. 293T wurde in einem modifizierten DMEM-Medium (DMEM/H) kultiviert:

DMEM, 4,5% Glukose (BioWhittaker)  
10% hitzeinaktiviertes FKS  
2mM Glutamin  
1x Penicillin/Streptomycin  
1x nicht-essentielle Aminosäuren  
25 mM HEPES

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen 293T auf  $0,9 \cdot 10^6$  Zellen pro T25-Flasche und Transfektionsansatz in 5ml DMEM/H ausgesät. 4 h vor Transfektion wurde das Medium gegen frisches, auf Raumtemperatur (RT) erwärmtes DMEM-H (3ml) ersetzt. Die Transfektion erfolgte laut Vorschrift des kommerziellen Protokolls (Invitrogen). 1 ml des Transfektionsansatzes wurde zu der jeweiligen Flasche unter vorsichtigem Hinzutropfen pipettiert. Das DNS- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitat sollte fein verteilt sich auf den adhären Zellen niederlegen.

Am darauffolgenden Morgen wurde das Medium gegen frisches, auf RT erwärmtes DMEM/H ausgetauscht. 6 h später erfolgte die Kokultivierung mit den aktivierten PBLs .

#### **Transduktion der aktivierten PBLs - Aktivierung peripherer Blut-Lymphozyten (PBLs)**

3 Tage vor der angesetzten Kokultivierung wurden fikollisierte PBLs zu  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in huRPMI-P jeweils in 2 ml einer 24 Well-Platte (Zellgewebe-behandelte Oberflächen) ausgesät. Die Aktivierung erfolgte über den kreuz-vernetzenden Antikörper OKT-3 (Orthoclone-Diagnostics) zu 20 ng/ml.

huRPMI-P:

RPMI 1640 (2mM Glutamin) ohne Phosphat (Life Tec., 11877-032 )

10 % humanes, hitzeinaktiviertes AB-Serum (HLA-A2.1 seropositiv)

25 mMHEPES

1 x Penicillin/Streptomycin (Life Tec.)

Die Platten wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Kokultivierung**

Zur Kokultivierung wurden die aktivierten PBLs aus den jeweiligen Vertiefungen einer 24-Well-Platte vereinigt und gezählt. Adhärenente Monozyten wurden verworfen. Die Zellen werden abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT) und in einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in frischem huRPMI-P aufgenommen und in den Brutschrank zurückgestellt. Das Medium wurde zuvor zu 400 U/ml IL-2 (Chiron) und 5 µg/ml Polybren (Sigma) eingestellt.

Jeder Transfektionsansatz wurde 6h nach Mediumwechsel nacheinander trypsiniert: hierzu wurde jede T25 mit 3 ml HBSS (Life Technologies) gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA (Life Technologies) für maximal 5 Minuten inkubiert, die gelösten Zellen quantitativ aufgenommen und in 4ml vorgelegtes huRPMI-P (RT) unter Rühren getropft. Die 293T Zellen werden mit 2500 rad bestrahlt. Diese werden abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT) und in 4 ml frisches, eingestelltes huRPMI-P, mit 400U/ml IL-2 und 5µg/ml Polybren supplementiert, resuspendiert. Zu dem Ansatz wurde 1 ml der eingestellten PBLs gegeben und der Ansatz ( $0,5 \cdot 10^6$  PBLs/ml) für drei Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Am Tag 3 nach Kokultivierung wurden die suspendierten PBLs abgenommen und in frischem, mit 40 U/ml IL-2 (Chiron) und 2,5 µl CD3/CD28-Beads supplementiertem Medium huRPMI-P zu  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. 3 Tage später erfolgte ein neuerlicher Split in frisches Medium. In diesen 7 Tagen wurde maximal expandiert bis zum Übergang auf T75-Flaschen. Diese Zellen konnten direkt in einer immunologischen Anfärbung (FACS-Analyse) oder in einem klassischen <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest eingesetzt werden.

### **Beispiele der FACS-Analyse**

Die oben beschriebenen Konstrukte wurden nach retroviraler Transduktion im "fluorescence activated cell sorting" (FACS) analysiert. Hierzu wurden  $0,25 \cdot 10^6$  Zellen sättigend mit Fluorophor-markierten Antikörpern gefärbt: die heterolog exprimierte mutierte β-Kette wurde mit anti-vβ6-FITC (BD) nachgewiesen; die Gesamtheit der T-Zellen über den Marker anti-CD3-PC5 (Coulter-Beckman). Als Negativ-Kontrolle diente eine mit dem leeren pStitch-Derivat transduzierte Probe. Die Expression konnte in mehreren Donoren HLA-A2 - positiver T-Zellen reproduziert werden. Für die Tetramer-Anfärbung wurden 5 µl einer 0,28 mg/ml Vorratslösung für 45 min bei 8°C verwendet.

### **Cytolytische Aktivität der transduzierten T-Zellen**

Die transduzierten T-Zellen wurden in einem klassischen  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest auf ihre zytotoxische Spezifität hin überprüft. In diesem System wurden Zielzellen radioaktiv durch Inkorporation von  $^{51}\text{Chrom}$  markiert. Erkannten die retroviral modifizierten Effektorzellen die Zielzelle peptidspezifisch, wurden letztere durch die Effektorfunktionen der T-Zelle in die Apoptose getrieben und durch Lyse getötet. Das Ausmaß des freigesetzten Chrom-Nuklids trifft eine Aussage über die Effektivität der Zell-Erkennung und Lyse. Die Effektivität wurde über einen weiten Bereich des Verhältnisses eingesetzter Effektor-Zellen zu Zielzellen (E:T) getestet. Als Referenz diente ein muriner MDM2-81-88 peptidspezifischer T-Zell-Klon, aus dem T-Zell-Rezeptor-Gene isoliert wurden. Als Zielzellen dienten:

T2: humane TAP-defiziente Zelllinie die exogen mit beliebigem Peptid zu beladen war. Das spezifische mutierte Peptid war MDM2-81-88, ein irrelevantes Kontroll-Peptid entstammte dem Influenza-Matrixprotein FluM1.

Saos-2/6: Transfektante der humanen Osteosarcoma Saos-2-Zelllinie, die MDM2 heterolog exprimiert und endogen prozessiert.

UocB11, EU-3: prä-B-Zell-Leukämie

IM-9: Plasmocytom

BV173: prä-B-Zell-Leukämie



### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren spezifischen Wildtyp- oder chimären T-Zell Rezeptors (TZR), der eine erste Kette und eine zweite Kette enthält, die miteinander an mindestens einer Oberfläche wechselwirken, wobei die mindestens eine Oberfläche einer rationalen Mutagenese unterzogen wird, so daß die mindestens eine Oberfläche der ersten Kette oder die Oberfläche der zweiten Kette eine räumlich hervorstehende Gruppe umfaßt, die mit einer räumlich zurückgesetzten Gruppe auf der mindestens einen Oberfläche der entsprechenden ersten Kette oder zweiten Kette wechselwirkt, umfassend die Schritte von:
  - (a) zu Verfügung stellen der DNA-Moleküle, die die kodierenden Bereiche für die mindestens eine zu mutierende Oberfläche der ersten Kette oder zweiten Kette umfassen, in einem gemeinsamen oder getrennten Mutagenese-Vektorsystem(en),
  - (b) Mutagenese der DNA-Moleküle auf an sich bekannte Weise, wobei die für die mindestens eine Oberfläche kodierende Nukleinsäuresequenz im Vergleich zu der Ausgangssequenz so verändert wird, daß  
in die mindestens eine Oberfläche der ersten Kette oder die mindestens eine Oberfläche der zweiten Kette eine räumlich hervorstehende Gruppe eingeführt wird, und  
in die entsprechend in Wechselwirkung stehende mindestens eine Oberfläche der zweiten Kette oder der ersten Kette eine räumlich zurückgesetzte Gruppe eingeführt wird, wodurch einzelne Mutanten-Fragmente hergestellt werden, und
  - c) Translation von mindestens zwei der einzelnen Mutanten-Fragmente aus Schritt b), so daß die Paarung des heterodimeren, mindestens an einer Oberfläche mutierten spezifischen ersten-Kette/zweite-Kette TZR selektiv gefördert wird, und
  - d) Präsentation des heterodimeren erste-Kette/zweite-Kette TZR durch eine T-Zelle.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Schritt c) durch folgende Schritte ersetzt wird:
  - (c') gegebenenfalls Umklonierung der Mutanten-Fragmente in geeignete Transfektions-Vektorsysteme,
  - (c'') Transfektion oder Cotransfektion oder Transduktion mindestens zwei der Mutanten-Fragmente in eine Mutanten TZR-defiziente T-Zelle, und

(c'') Expression des heterodimeren erste-Kette/zweite-Kette TZR in einer rekombinanten T-Zelle.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Schritt c) durch folgende Schritte ersetzt wird:  
c') *In vitro*-Translation oder *in vivo*-Translation von mindestens zwei der einzelnen Mutanten-Fragmente aus Schritt b) und gegebenenfalls anschließende Isolierung und/oder Reinigung der translatierten Mutanten-Fragmente, so daß die Paarung des heterodimeren, mindestens an einer Oberfläche mutierten spezifischen ersten-Kette/zweite-Kette TZR selektiv gefördert wird, und  
c'') Einbringung der mutierten spezifischen ersten-Kette/zweite-Kette TZR in eine T-Zelle.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die *in vivo* Translation in einer Wirtszelle erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei die Einbringung durch Liposomen-Transfer erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei es sich bei dem TZR um einen alpha/beta TZR, gamma/delta TZR, einen humanisierten oder partiell humanisierten TZR, einen mit zusätzlichen (funktionellen) Domänen versehenen TZR, einen mit alternativen Domänen versehenen TZR, z.B mit einer anderen Transmembran-Domäne als Membrananker versehenen TZR handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführte Aminosäure weiter geeignet chemisch modifiziert wird, um dadurch eine räumlich hervorstehende Gruppe oder eine räumlich zurückgesetzte Gruppe einzuführen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführte Aminosäure die räumlich hervorstehende Gruppe oder die räumlich zurückgesetzte Gruppe direkt zur Verfügung stellt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die durch die Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführten Aminosäuren so gewählt sind, daß ein wechselseitiger Austausch

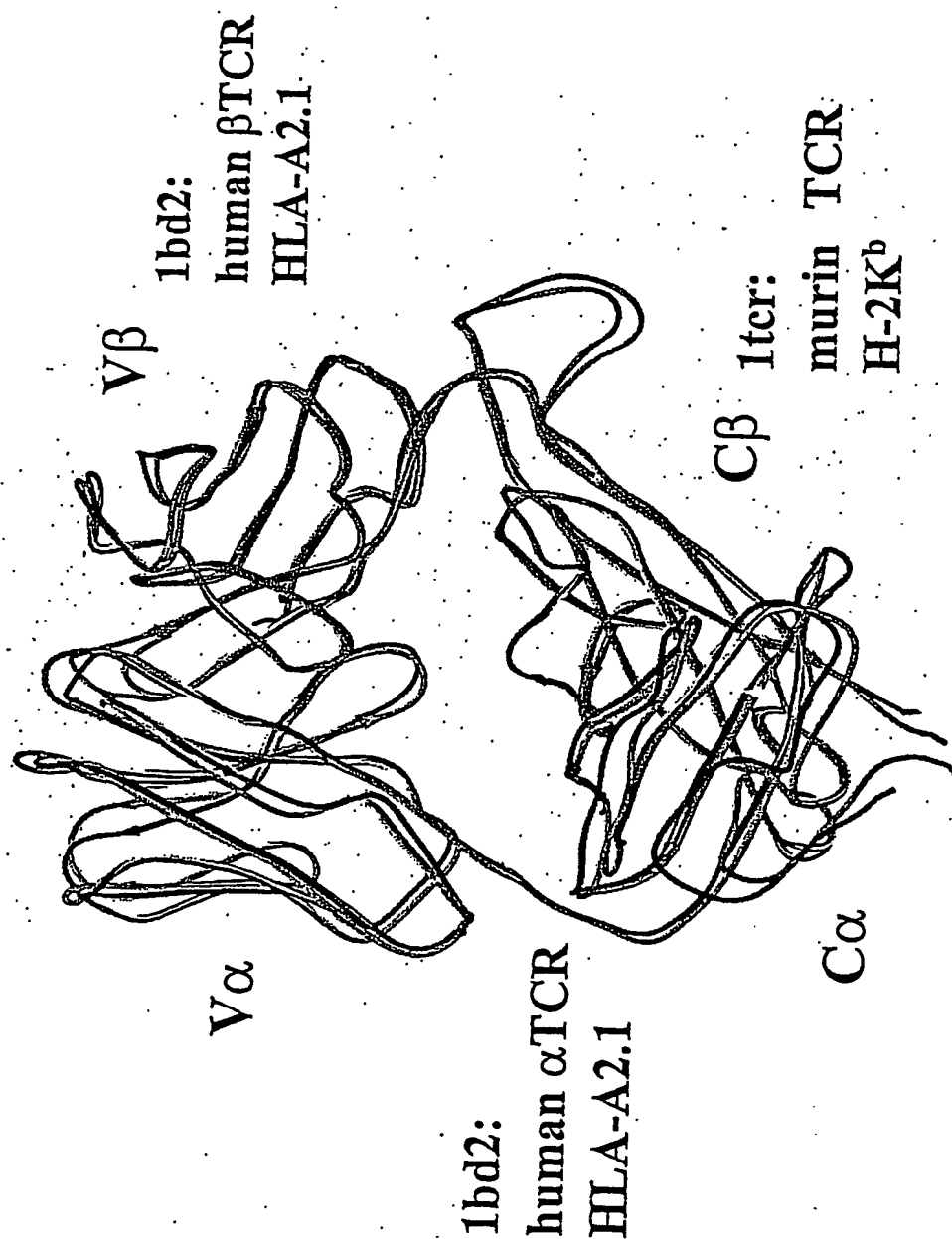
der Aminosäuren der an den Oberflächen der wechselwirkenden Ketten des TZR erreicht wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführte Aminosäure, die gegenüber der Ausgangssequenz eine räumlich zurückgesetzte Gruppe einführt, ausgewählt ist aus Glyzin, Serin, Threonin, Valin und Alanin.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die nach der Mutagenese der DNA-Moleküle eingeführte Aminosäure, die gegenüber der Ausgangssequenz eine räumlich hervorstehende Gruppe einführt, ausgewählt ist aus Tryptophan, Lysin, Arginin, Phenylalanin, Cystein und Tyrosin.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei mindestens zwei Oberflächen einer TZR-Kette gleichzeitig einer Mutagenese unterzogen werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die entsprechend in Wechselwirkung stehenden Oberflächen in den variablen Domänen der TZR-Ketten lokalisiert sind.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die entsprechend in Wechselwirkung stehenden Oberflächen in den konstanten Domänen der TZR-Ketten lokalisiert sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die zu mutierenden Domänen der TZR-Ketten ausgewählt sind aus Säugetier, insbesondere menschlichen und/oder Maus-Domänen.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die rationale Mutagenese der TZR-Ketten gleichzeitig zu einer Humanisierung des TZR führt.
17. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei als alpha-Kette und beta-Kette die alpha- und beta-Ketten eines MDM2(81-88)-spezifischen TZR verwendet werden und wobei das Gly192 der konstanten Region der alpha-Kette und das Arg208 der konstanten Region der beta-Kette gegen Arg 192 in der konstanten Region der alpha-Kette und gegen Gly208 in der konstanten Region der beta-Kette ausgetauscht werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei gleichzeitig mit oder anschließend an die Austausche an Positionen 192 und 208 weitere Positionen in den Ketten modifiziert werden.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei als Transfektionssystem ein retroviraler Vektor, insbesondere pBullet verwendet wird.
20. Mutierte alpha- oder beta-Kette eines TZR, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19.
21. Mutierter TZR, insbesondere mutierter MDM2(81-88)-spezifischer TZR (Seq ID Nr. 2 und Seq ID Nr. 5), umfassend mindestens eine mutierte alpha- und beta-Kette gemäß Anspruch 20.
22. Isolierte Nukleinsäure, die eine für eine mutierte alpha- oder beta-Kette eines TZR nach Anspruch 20 kodierende Sequenz umfaßt.
23. DNS- oder RNS-Vektormolekül, das mindestens eine oder mehrere Nukleinsäure(n) nach Anspruch 22 umfaßt und das in Zellen exprimierbar ist.
24. Wirtszelle, die ein DNS- oder RNS-Vektormolekül gemäß Anspruch 19 enthält.
25. Rekombinante T-Zelle, die mindestens einen mutierten TZR gemäß Anspruch 21 exprimiert.
26. Zusammensetzung, die eine rekombinante T-Zelle gemäß Anspruch 25 umfaßt.
27. Verwendung einer mutierten alpha- oder beta-Kette eines TZR gemäß Anspruch 20, eines mutierten TZR gemäß Anspruch 21 und/oder einer rekombinanten T-Zelle gemäß Anspruch 25 zur Herstellung von Therapeutika und/oder Prophylaktika zur Behandlung von Krebserkrankungen.

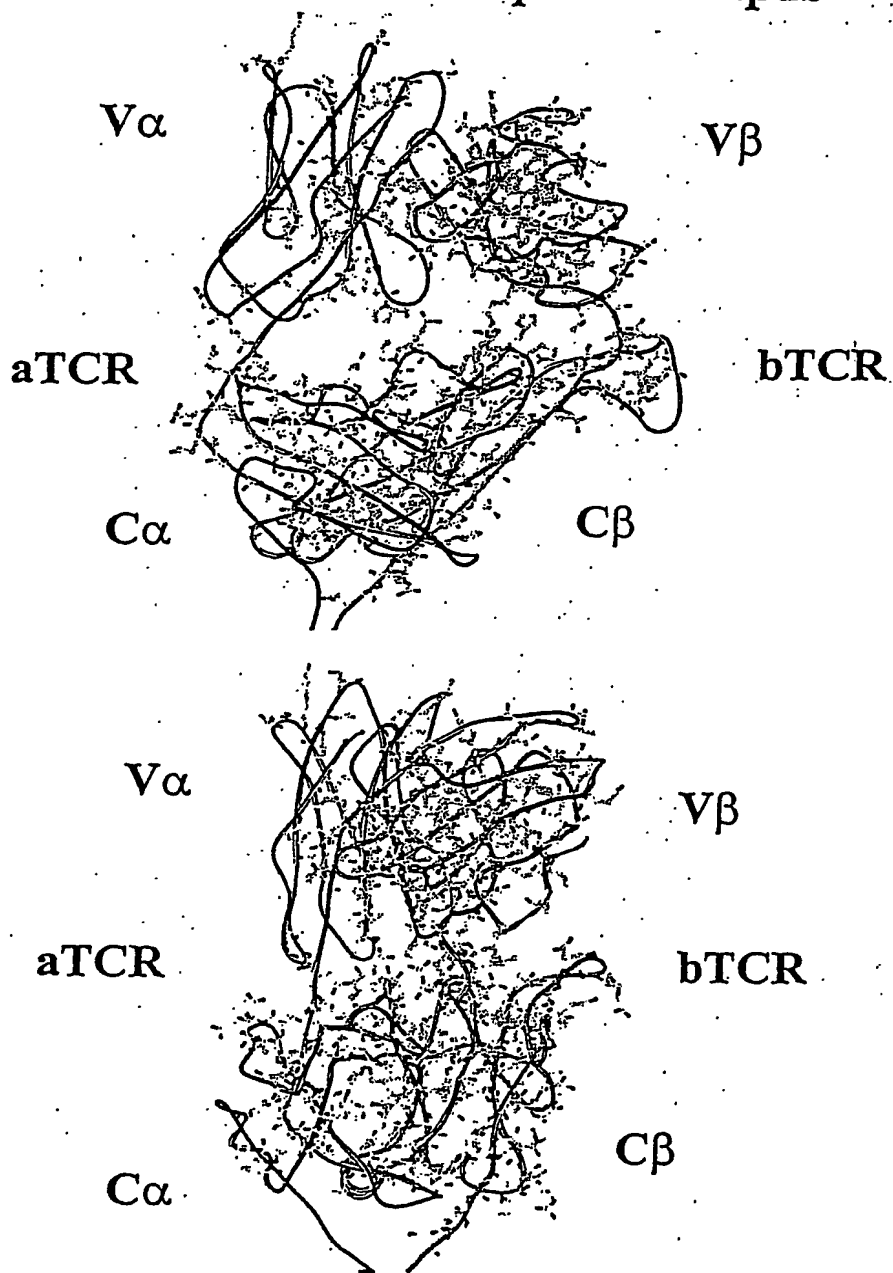
28. Verwendung gemäß Anspruch 27, wobei eine Krebserkrankung behandelt wird, die mit einer veränderten Expression von MDM2, p53, Her-2/neu, Ras, Tyrosinase, MART, Gp100, MAGE, BAGE, MUC-1, CD45, CD19 oder PRDI-BF1 in Zusammenhang steht.

Figur 1



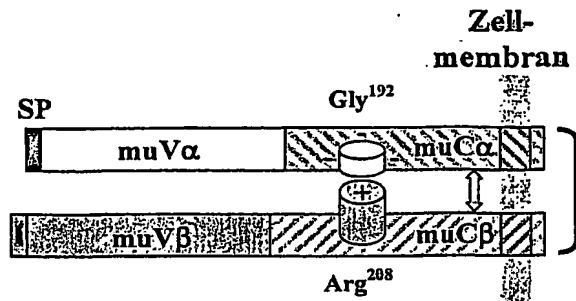
Figur 2

Identische Aminosäuren 1tcr.pdb / 1bd2.pdb

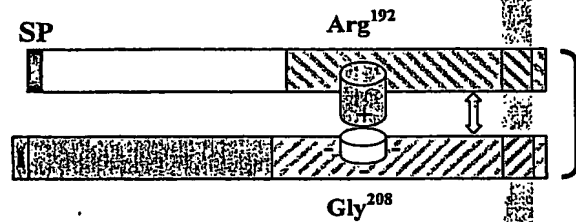


*Doppelketten-TCRs:*

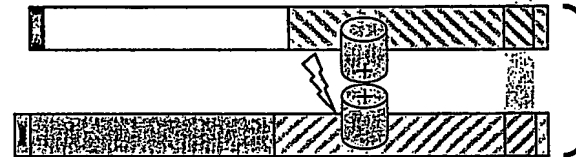
Mu Wt TCR MDM2



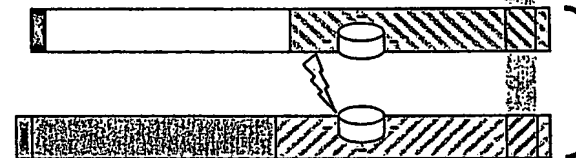
Mu Mutα/Mutβ TCR MDM2



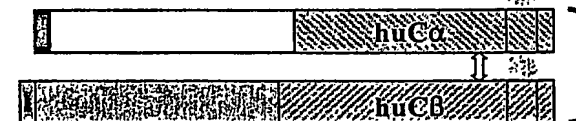
Mu Mutα/Wtβ TCR MDM2



Mu Wtα/Mutβ TCR MDM2



Mu Chim TCR MDM2



*Einzelketten-TCR:*



Figur 3

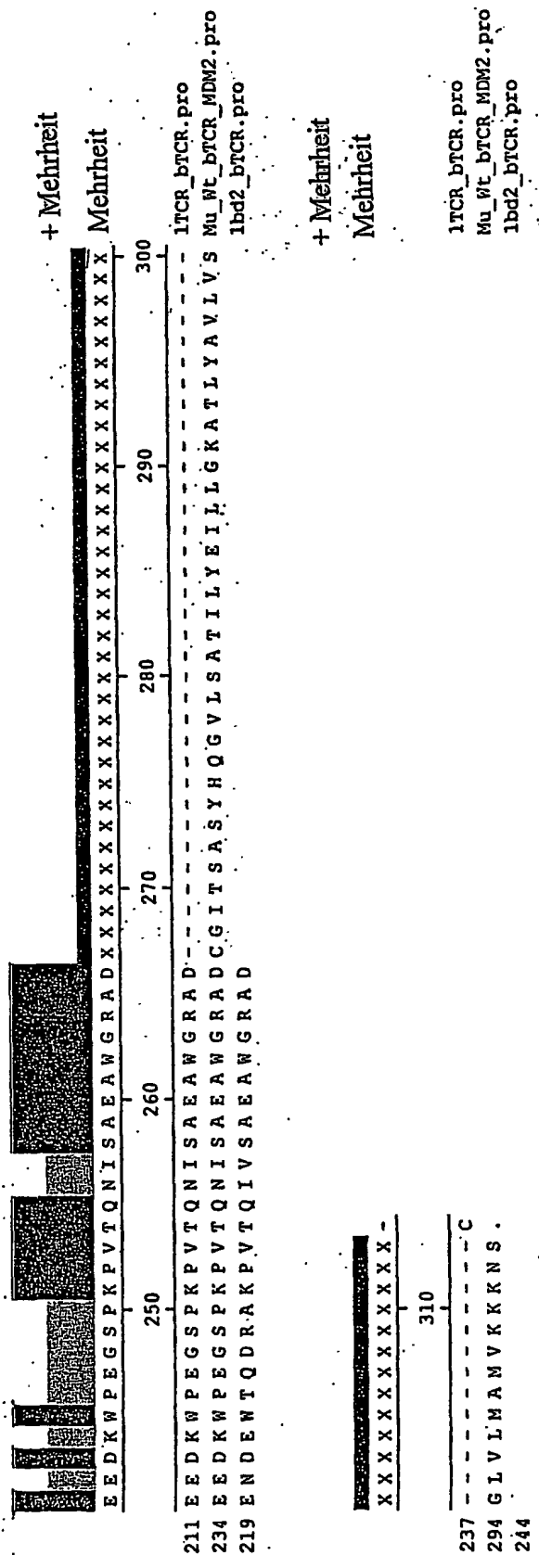
Mu sc(GGGGS)<sub>3</sub> TCR MDM2



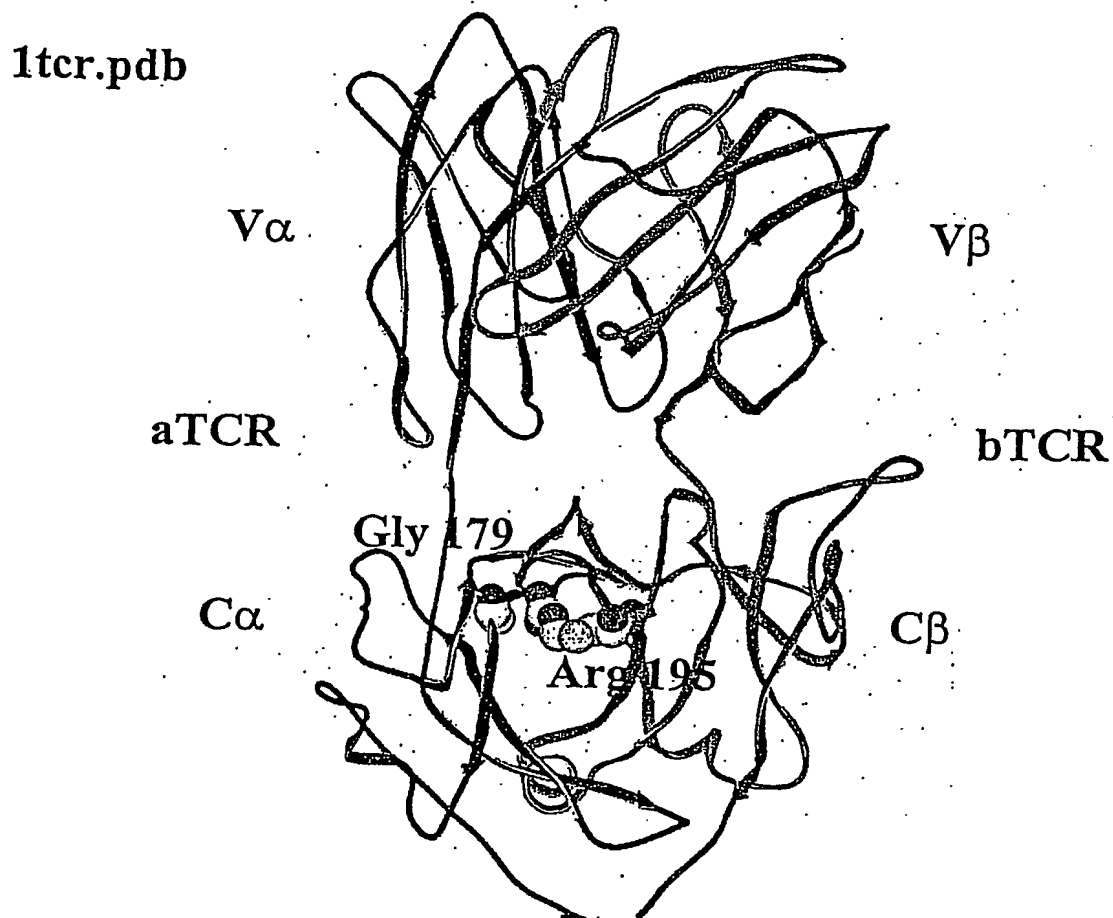




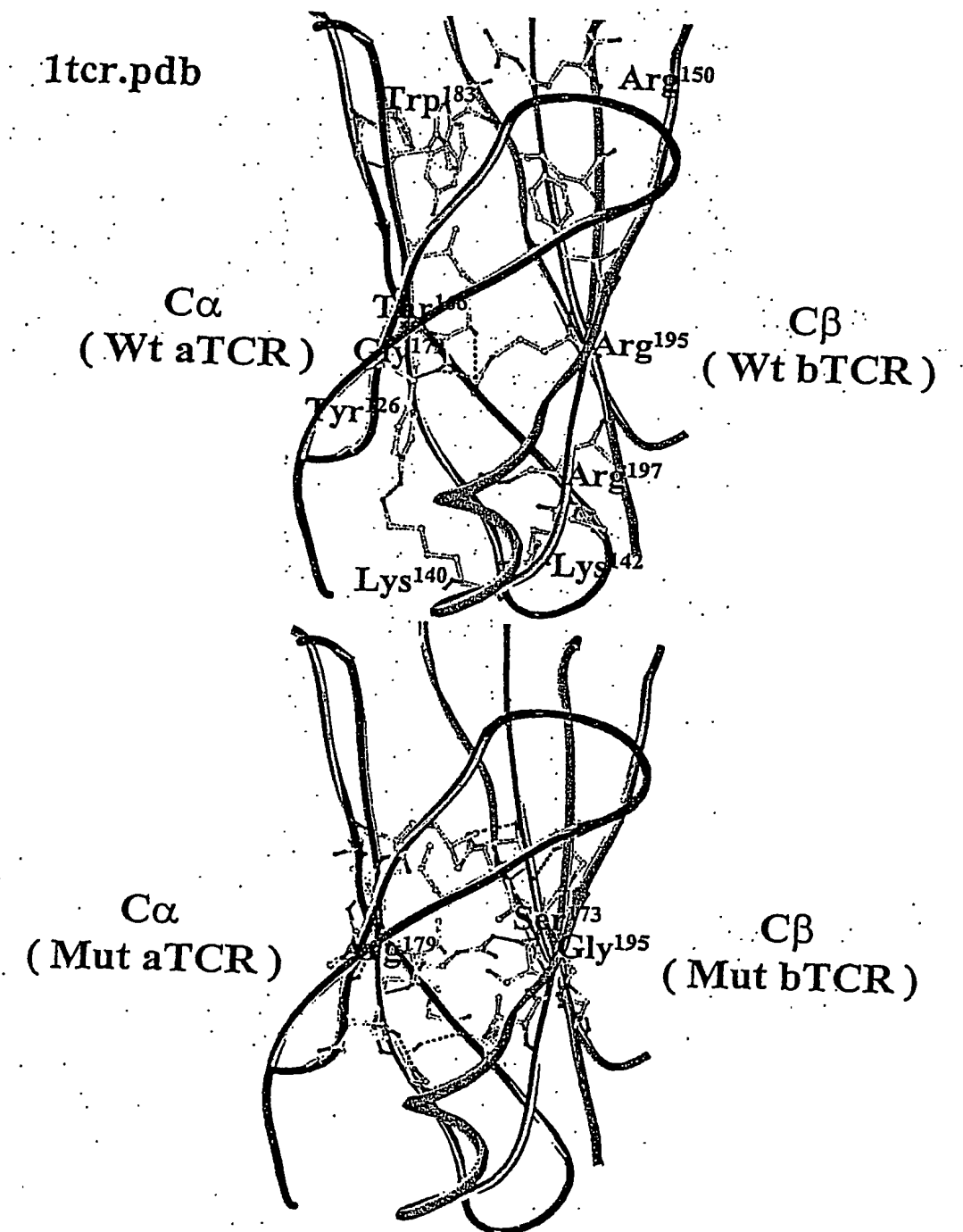
Figur 4b (Fortsetzung)



Figur 5

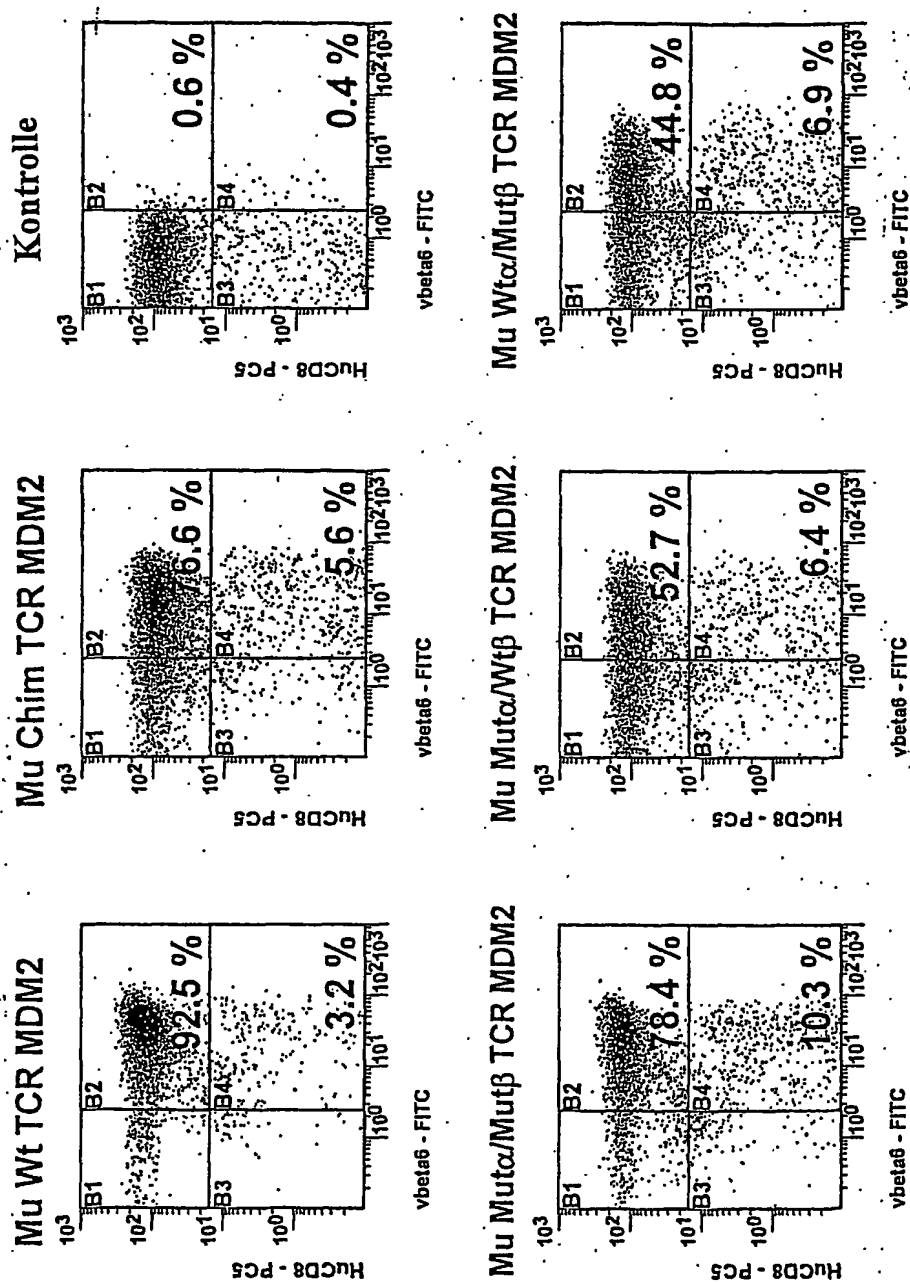


Figur 6



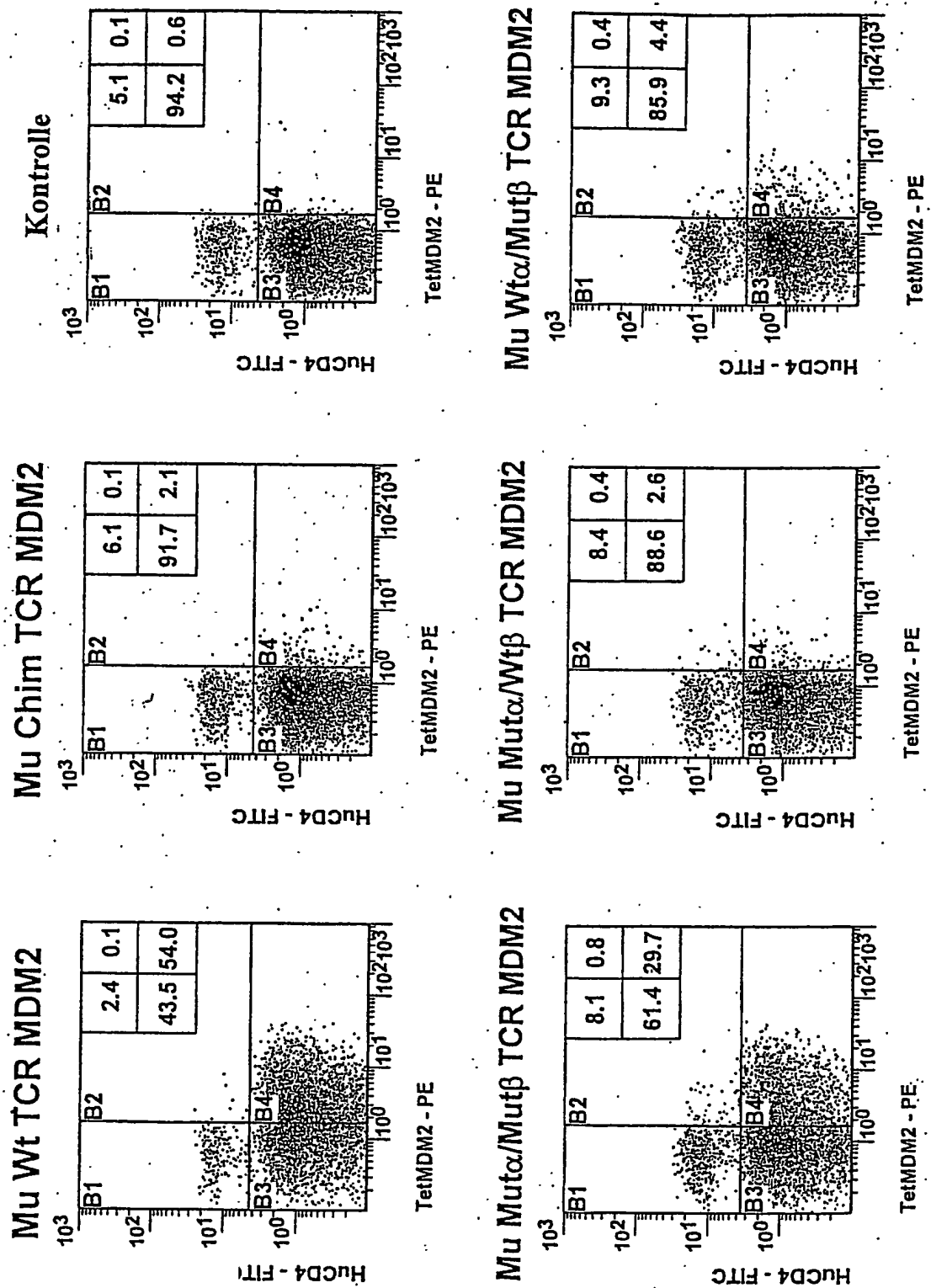
Figur 7

v $\beta$ 6-Färbung von langfristigen Kulturen von transduzierten PBMCs



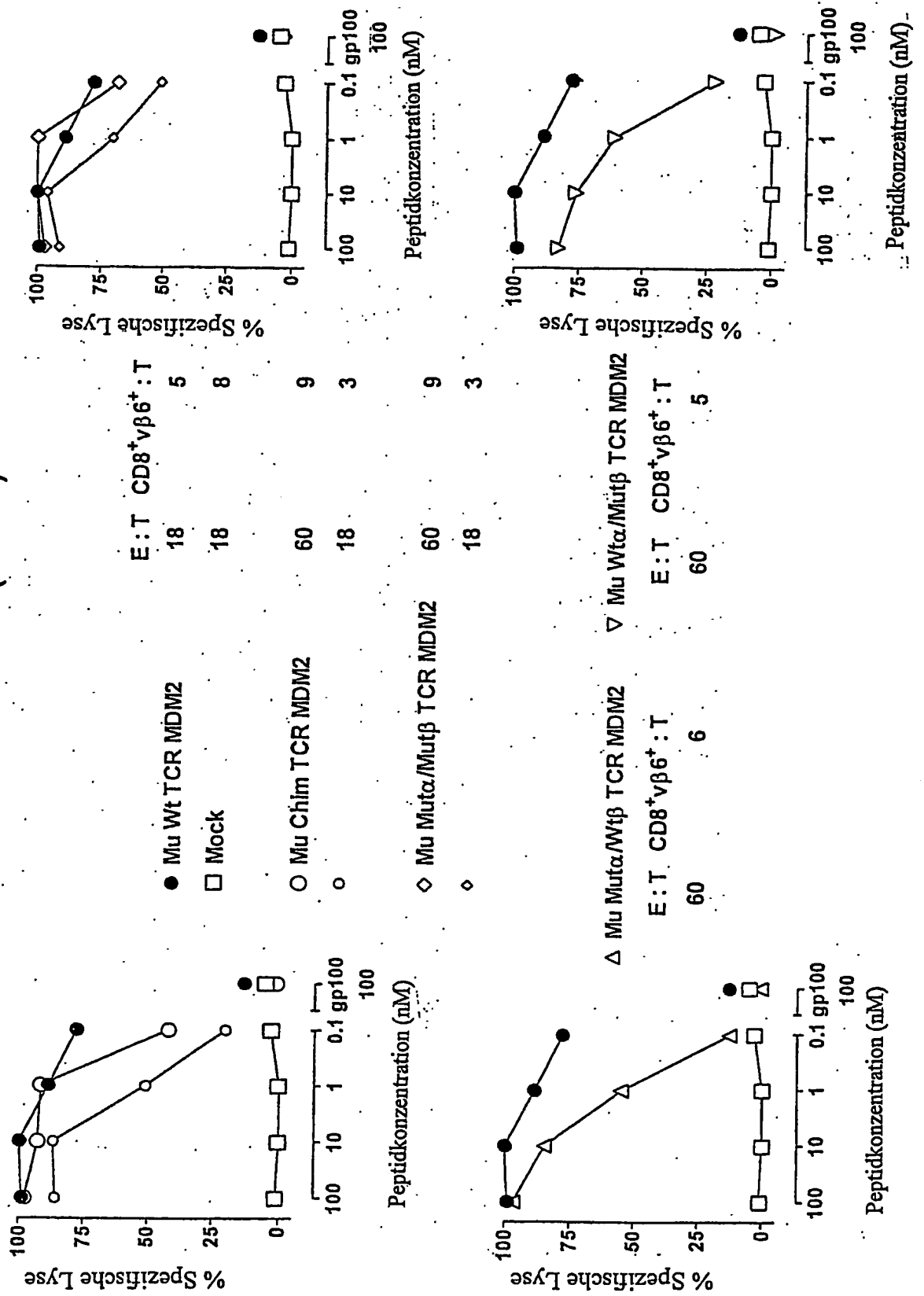
Figur 8

TetMDM2-Färbung von langfristigen Kulturen von transduzierten PBMCs



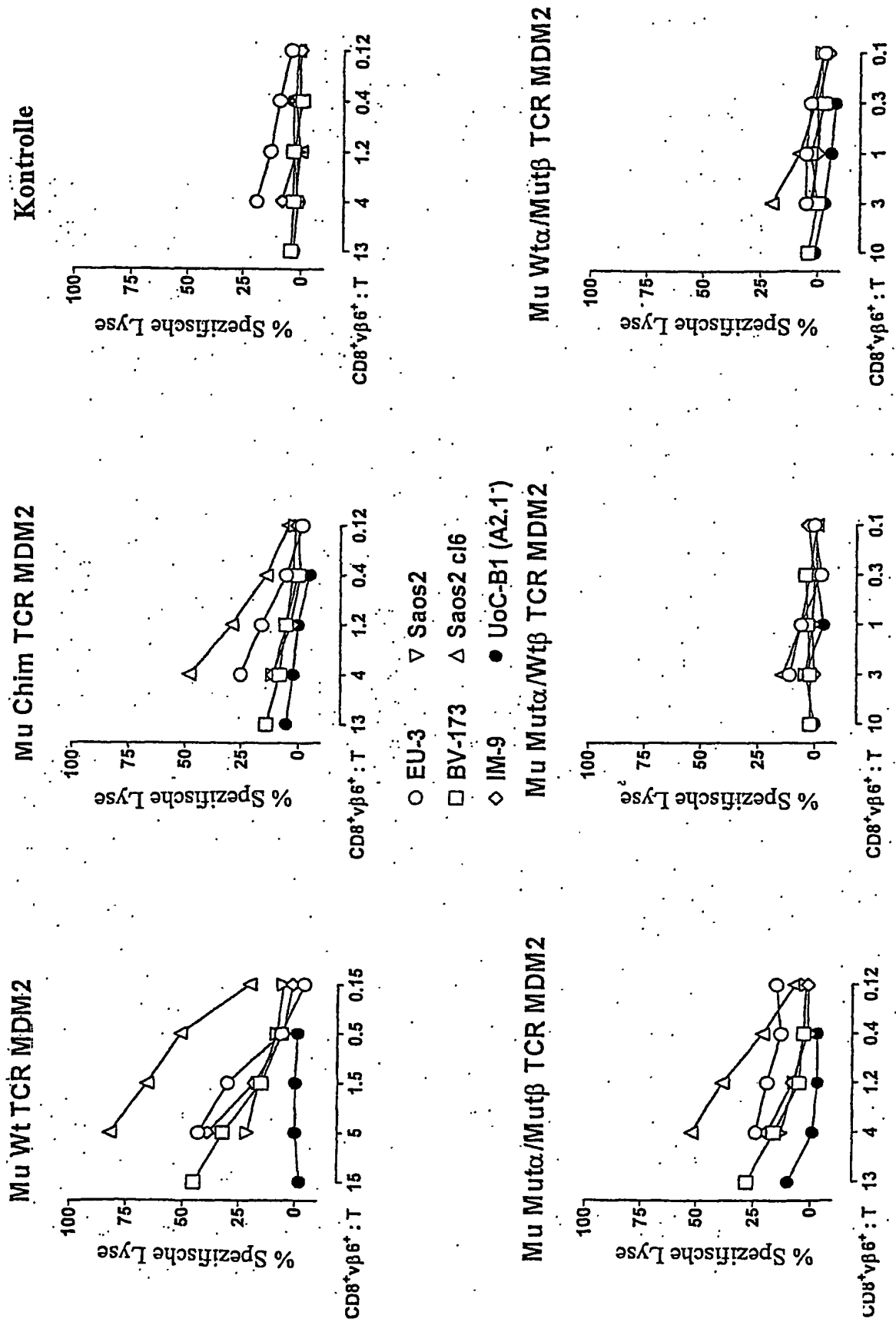
Figur 9

# T 2 + MDM2 (81-88)

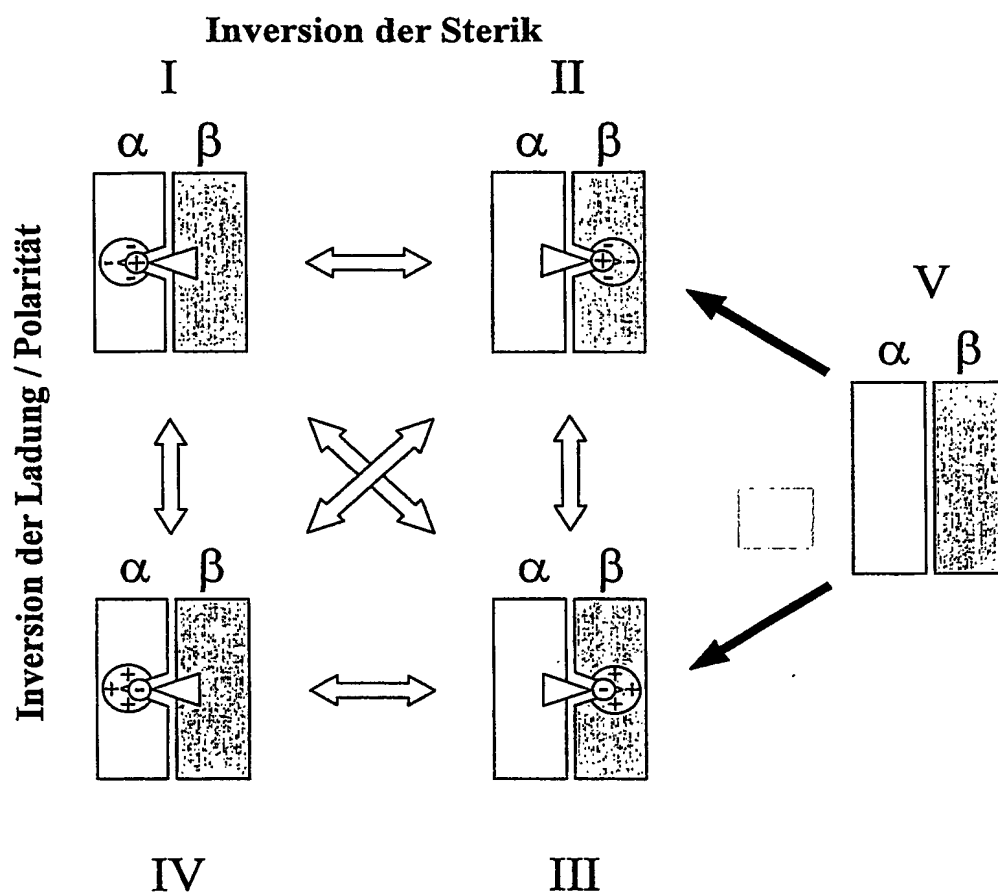




Figur 10



Figur 11



## SEQUENCE LISTING

<110> Johannes Gutenberg Universität Mainz

<120> Verfahren zur rationalen Mutagenese von alpha/beta T-Zell Rezeptoren und entsprechend mutierte hdm2-Protein spezifische alpha/beta T-Zell Rezeptoren

<130> U30031

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 200

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val Ser Glu Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Ala Thr Pro Tyr Leu  
20 25 30

Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gln Gly Leu Gln Leu Leu Lys Tyr  
35 40 45

Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn Gly Phe Glu Ala Glu  
50 55 60

Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg Lys Ala Ser Val His  
65 70 75 80

Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Val Ser Gly Phe Ala Ser  
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Ile Val Leu Pro Tyr Ile  
100 105 110

Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Ala Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln  
115 120 125

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val  
130 135 140

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Ala Thr Val Leu

145                                      150                                      155                                      160

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser  
165                                      170                                      175

Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala  
180                                      185                                      190

Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro  
195                                      200

<210> 2  
<211> 236  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 2

Met Lys Arg Leu Leu Cys Ser Leu Leu Gly Leu Leu Cys Thr Gln Val  
1                                      5                                      10                                      15

Cys Trp Val Lys Gly Gln Gln Val Gln Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val  
20                                      25                                      30

Leu Gln Glu Gly Glu Asn Ala Glu Leu Gln Cys Asn Phe Ser Ser Thr  
35                                      40                                      45

Ala Thr Arg Leu Gln Trp Phe Tyr Gln Arg Pro Gly Gly Ser Leu Val  
50                                      55                                      60

Ser Leu Leu Tyr Asn Pro Ser Gly Thr Lys His Thr Gly Arg Leu Thr  
65                                      70                                      75                                      80

Ser Thr Thr Val Thr Lys Glu Arg Arg Ser Ser Leu His Ile Ser Ser  
85                                      90

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Ser Ser Val  
100                                      105                                      110

Asn Thr Gly Asn Tyr Lys Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Lys  
115                                      120                                      125

Val Ile Ala His Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys  
130                                      135                                      140

Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
 145 150 155 160

Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr  
 165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly  
 180 185 190

Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe  
 195 200 205

Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala  
 210 215 220

Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn  
 225 230 235

<210> 3  
 <211> 196  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 3

Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg  
 1 5 10 15

Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe  
 20 25 30

Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser  
 35 40 45

Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Ala Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe  
 50 55 60

Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser Leu His Ile Val Pro Ser Gln  
 65 70 75 80

Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Met Glu Gly Ala Gln  
 85 90 95

Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Ile Asn Pro Asn Ile  
 100 105 110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser  
 115 120 125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val  
 130 135 140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Lys Thr Val Leu Asp  
 145 150 155 160

Met Asp Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn  
 165 170 175

Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro  
 180 185 190

Glu Asp Thr Phe  
 195

<210> 4  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 4

Glu Ala Ala Val Thr Gln Ser Pro Arg Asn Lys Val Ala Val Thr Gly  
 1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Leu Ser Cys Asn Gln Thr Asn Asn His Asn Asn Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Thr Gly His Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr  
 35 40 45

Ser Tyr Gly Ala Gly Ser Thr Glu Lys Gly Asp Ile Pro Asp Gly Tyr  
 50 55 60

Lys Ala Ser Arg Pro Ser Gln Glu Asn Phe Ser Leu Ile Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Ala Thr Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Gly Gly Gly  
 85 90 95

Gly Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Ser Val Leu Glu Asp  
 100 105 110

Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys  
 115 120 125

Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg  
 130 135 140

Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys  
 145 150 155 160

Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser  
 165 170 175

Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe  
 180 185 190

Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly  
 195 200 205

Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr  
 210 215 220

Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp  
 225 230 235

<210> 5  
 <211> 307  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 5

Leu Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr  
 1 5 10 15

Val Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys  
 20 25 30

Phe Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln  
 35 40 45

Asn Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys  
 65 70 75 80

Gly Asp Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser  
 85 90 95

Phe Ser Leu Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe  
 100 105 110

Leu Cys Ala Ser Gly Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly  
 115 120 125

Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys  
 130 135 140

Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys  
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu  
 165 170 175

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr  
 180 185 190

Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser  
 195 200 205

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe  
 210 215 220

Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro  
 225 230 235 240

Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp  
 245 250 255

Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val  
 260 265 270

Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu  
 275 280 285



Tyr Ala Val Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys  
 290 295 300

Lys Asn Ser  
 305

<210> 6  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 6

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly  
 1 5 10 15

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr  
 35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr  
 50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser  
 65 70 75 80

Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Pro  
 85 90 95

Gly Gly Gly Phe Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr  
 100 105 110

Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe  
 115 120 125

Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val  
 130 135 140

Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp  
 145 150 155 160

Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro

165

170

175

Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser  
180 185 190

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe  
195 200 205

Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr  
210 215 220

Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp  
225 230 235 240

Gly Arg Ala Asp

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**